INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**MARCADORES MOLECULARES DERIVADOS DA BOMBESINA PARA DIAGNÓSTICO DE
TUMORES POR SPECT E PET**

Priscilla Brunelli Pujatti

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Prof. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**SÃO PAULO
2012**

À papai e mamãe. “Tudo que um sonho precisa para ser realizado é de alguém que acredite nele” (*Roberto Shinyashiki*).

Ao Marco. “Ter um irmão é ter para sempre uma infância lembrada com segurança em outro coração” (*Tati Bernardi*).

Ao João. “A medida do amor é amar sem medida” (*Santo Agostinho*).

À Tati (*in memoriam*). “Para estar junto não é preciso estar perto, e sim dentro” (*Leonardo da Vinci*).

AGRADECIMENTOS

À Deus. “A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável” (*Galileu Galilei*).

À minha orientadora. “O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente” (*Texto budista*).

Aos meus supervisores de estágio de doutorado no exterior, Dr. Stephen Mather e Dra. Jane Sosabowski. “Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo” (*Hermann Hesse*).

Ao Msc. Jair Mengatti pelo apoio e provimento dos recursos necessários para realização deste trabalho sempre que necessário.

À Adriana e Camila pela amizade e colaboração em todas as etapas do trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Imagem Molecular do Centro de Oncologia Molecular, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London: Julie Foster, Ciara Finucane, Jerome Barnet, Chantelle Hudson e Alex Papple.

À Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto pelo auxílio na realização dos estudos computacionais.

Ao Dr. Carlos Soares e à Dra. Miriam Suzuki pela colaboração no cultivo de células.

Ao Msc. Luís Alberto pela amizade e colaboração nos estudos com ⁶⁸Ga.

À Beatriz Dorr Carniceiro pela colaboração com os estudos toxicológicos.

“Ninguém consegue realizar nada sem a colaboração de muitos” (*Paola Rhoden*).

Aos amigos: Adriana, Camila, Renata, Akin, Ricardo, Guilherme, Laura, Kátia, Mayla, Bruna e Laís. “A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você” (*Ralph Waldo Emerson*).

Aos amigos:

da divisão de Produção de Radiofármacos da Diretoria de Radiofarmácia, em especial à Msc. Marysel e Rosana;

da divisão de Controle de Qualidade da Diretoria de Radiofarmácia, em especial à Msc. Neusa, Dra. Margareth, Vívian, Idelí, Patrícia e Nathanael;

da divisão de Garantia da Qualidade da Diretoria de Radiofarmácia, em especial à Dra. Maria Tereza Colturato;

da divisão de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia.

"Não existe esta coisa de homem 'feito por si mesmo'. Somos formados por milhares de outros. Cada pessoa que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou dito uma palavra de encorajamento para nós, entrou na formação do nosso caráter e nossos pensamentos, tanto quanto do nosso sucesso" (*George Matthew Adams*).

Às amigas Vívian, Camila, Marcella e Flaviana. “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” (*Fernando Sabino*).

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial à Diretoria de Radiofarmácia, onde a maior parte dos estudos deste trabalho foi realizada.

Ao Hemocentro da UNICAMP, pelo fornecimento das células PC-3 utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Biotério do IPEN, em especial à Neide pelo cuidado com os animais.

Aos funcionários da divisão de pós-graduação do IPEN.

Aos demais amigos e familiares de todas as partes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e reserva técnica concedidas, fundamentais para o desenvolvimento e divulgação do trabalho no país e no exterior.

"Sorria, brinque, chore, beije, morra de amor, sinta, sonhe, grite e, acima de tudo, viva. O fim nem sempre é o final. A vida nem sempre é real. O passado nem sempre passou. O presente nem sempre ficou e o hoje nem sempre é agora. Tudo o que vai, volta. E se voltar é porque é feito de amor".

(Autor desconhecido)

MARCADORES MOLECULARES DERIVADOS DA BOMBESINA PARA DIAGNÓSTICO DE TUMORES POR SPECT E PET

Priscilla Brunelli Pujatti

RESUMO

Uma grande variedade de moléculas já foi identificada por apresentar alta afinidade por receptores superexpressos em células tumorais, e a radiomarcagem dessas moléculas oferece a possibilidade de novos compostos com aplicações diagnósticas e terapêuticas em medicina nuclear. Dentre essas moléculas, a bombesina (BBN) é uma das que despertam maior interesse, uma vez que um de seus receptores – BB_2 – são superexpressos em células de tumores de próstata, mama, cólon, pâncreas e pulmão, além de glioblastomas e neuroblastomas. Derivados da bombesina, agonistas e antagonistas dos receptores BB_2 já foram propostos para essa finalidade e apresentaram resultados promissores em estudos pré-clínicos. Entretanto, a maioria deles apresenta o inconveniente da alta captação em tecidos saudáveis, como pâncreas e intestino, o que pode prejudicar a eficiência diagnóstica e causar efeitos adversos na terapia. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a marcação de uma nova série de derivados da bombesina com índio-111 (^{111}In) e gálio-68 (^{68}Ga), de modo a avaliar seu potencial para diagnóstico de tumores que superexpressam BB_2 por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou por emissão de pósitrons (PET). Os peptídeos estudados apresentam estrutura genérica $YG_n\text{-BBN}(6\text{-}14)\text{-Q}$, em que Q é o grupamento quelante, n é o número de aminoácidos glicina do espaçador YG_n e $\text{BBN}(6\text{-}14)$ é a sequência original de aminoácidos da BBN do aminoácido 6 ao 14. Estudou-se também o derivado em que a metionina (Met) terminal da sequência da bombesina foi substituída pela norleucina (Nle). A avaliação experimental dos derivados da bombesina foi dividida em quatro etapas: estudos computacionais, marcadores moleculares para SPECT, marcadores moleculares para PET e estudos toxicológicos. Os estudos computacionais consistiram na determinação dos coeficientes de partição (log P) e distribuição (log D) teóricos dos derivados da bombesina conjugados ao quelante DTPA (ácido dietileno-triamino-pentacético e DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetracético). No desenvolvimento de marcadores moleculares para SPECT os derivados da bombesina de

diferentes espaçadores conjugados ao DTPA e radiomarcados com ^{111}In foram avaliados para determinação do melhor espaçador para aplicação *in vivo*, considerando não apenas as propriedades *in vivo*, mas também a estabilidade. Uma vez definido o espaçador, o derivado escolhido conjugado ao quelante DTPA ou DOTA foi submetido a estudos comparativos *in vitro* e *in vivo* utilizando linhagens tumorais que expressam os receptores BB_2 em níveis variados, de modo a determinar o agente quelante mais adequado para aplicação *in vivo*. Nessa fase experimental, alguns estudos foram realizados também com um derivado da BBN BZH3, amplamente descrito pela literatura. No desenvolvimento de marcadores moleculares para PET, o derivado composto pelo espaçador e quelante escolhido foi radiomarcado com ^{68}Ga e submetido a estudos de biodistribuição *in vivo*. Por fim, estudos toxicológicos em ratos foram realizados por meio da administração de um excesso dos derivados da BBN, a fim de avaliar a segurança para futura aplicação em estudos clínicos. Todos os derivados conjugados ao DTPA foram radiomarcados com ^{111}In com alta pureza radioquímica e alta atividade específica ($174 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$). Os marcadores moleculares obtidos apresentaram alta estabilidade frente à reação de marcação e baixa estabilidade à temperatura ambiente, a qual foi aumentada com a adição de agentes estabilizantes. A análise em soro humano indicou degradação tempo-dependente dos marcadores moleculares pelas enzimas do soro e aumento da estabilidade com o acréscimo de aminoácidos glicina no espaçador, bem como pela substituição da Met terminal pela Nle. Os estudos em CLAE e de log P confirmaram os resultados de log P teórico e indicaram que os marcadores moleculares apresentam baixa lipofilicidade, a qual decresce com o aumento do espaçador e aumenta com a substituição do aminoácido terminal. Os estudos *in vivo* demonstraram que os marcadores moleculares de DTPA- ^{111}In apresentam rápido clareamento sanguíneo, excreção primariamente renal e baixo acúmulo abdominal. O marcador molecular que apresentou maior captação tumoral foi aquele com a Nle terminal (YG_5N), e esse foi submetido à análise comparativa entre os quelantes bifuncionais DTPA e DOTA. O YG_5N -DOTA foi radiomarcado com ^{111}In com alta atividade específica ($100 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$). Ensaio de saturação em células de tumor de próstata (PC-3 e LNCaP) e mama (T-47D) *in vitro* demonstraram afinidade semelhante para o peptídeo conjugado a ambos quelantes, mas o YG_5N -DOTA- ^{111}In se ligou mais às células de tumor de próstata, mas não às células de tumor de mama. Esse marcador molecular também foi mais internalizado pelas células PC-3. Os estudos *in vivo* indicaram maior estabilidade do marcador molecular conjugado ao DOTA em soro de camundongo, mas captação dos dois peptídeos semelhante pelo tumor de células PC-3 e LNCaP, embora esse último tenha demonstrado uma concentração duas vezes menor do receptor BB_2 . A imagem SPECT/CT dos tumores foi possível com os dois peptídeos. Em comparação com o derivado BZH3- ^{111}In , os marcadores moleculares apresentaram captação tumoral semelhante, mas as imagens foram mais favoráveis devido à menor captação abdominal. O YG_5N -DOTA foi então radiomarcado com ^{68}Ga , obtendo-se alta pureza radioquímica, e seu perfil de distribuição foi semelhante ao do derivado radiomarcado com ^{111}In , com significativa captação pelo tumor de células PC-3. Os ensaios de tolerância toxicológica demonstraram que os derivados da bombesina são seguros até a concentração administrada, não apresentando toxicidade hematológica, hepática ou renal. O derivado da BBN YG_5N conjugado ao DTPA ou DOTA é uma ferramenta promissora e segura para o diagnóstico de tumores que superexpressam os receptores BB_2 por SPECT e PET.

MOLECULAR MARKERS DERIVED FROM BOMBESIN FOR TUMOR DIAGNOSIS BY SPECT AND PET

Priscilla Brunelli Pujatti

ABSTRACT

A high number of molecules have already been identified to have high affinity to some receptors overexpressed on tumour cells and the radiolabelling of those molecules offers the possibility of new compounds for tumour diagnosis and therapy by nuclear medicine. Among of those molecules, bombesin (BBN) has become focus of interest, as its BB₂ receptors are known to be overexpressed in prostate, breast, colon, pancreatic and lung tumour, as long as glioblastomas and neuroblastomas. BBN agonists and antagonists have already been described for this purpose and promising results were obtained in preclinical studies. However, most of them exhibited high abdominal accumulation, especially in pancreas and intestines, which can compromise diagnosis accuracy and cause serious adverse effects in therapy. In this context, the goal of the present work to radiolabel new BBN derivatives with ¹¹¹In and ⁶⁸Ga and to evaluate their potential for BB₂ positive tumors diagnosis by single photon emission tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET). The structure of studied peptides was Q-YG_n-BBN(6-14), where Q is the chelator, n is the number of glycine aminoacids in the spacer YG_n and BBN(6-14) is the original bombesin sequence from the aminoacid 6 to 14. The derivative in which the last aminoacid (methionine, Met) was replaced by norleucine (Nle) was also evaluated. The experimental evaluation of the bombesin derivatives was divided into four steps: computational studies, molecular markers for SPECT, molecular markers for PET and toxicological studies. The teorical partition (log P) and distribution (log D) coefficients were calculated for all bombesin derivatives conjugated to DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) and DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) chelators applying computational programmes. Bombesin derivatives for SPECT were developed by radiolabelling DTPA-conjugated bombesin derivatives with ¹¹¹In to determine the best spacer for *in vivo* applications, regarding the stability and *in vivo* properties. The derivative with the most favorable properties and conjugated to DTPA or DOTA was evaluated in comparative *in vitro* and *in vivo* studies in different BB₂ expressing tumour cells, in order to determine the best chelator to be used

in vivo. Some comparative studies were also performed with the BBN analogue BZH3, which was described by the literature. The molecular marker for PET was developed by radiolabelling the derivative chosen with ^{68}Ga and evaluating the biodistribution profile in healthy and tumour mice. Finally, toxicological studies were performed by injecting an excess of cold bombesin derivatives in rats to determine their safety for clinical queries. All derivatives conjugated to DTPA were radiolabelled with ^{111}In at high radiochemical purity and high specific activity ($174\text{ GBq}/\mu\text{mol}$). The molecular markers presented high stability during radiolabelling and low stability at room temperature and this stability was increased after the addition of stabilizer agents. Stability in human serum analysis suggested time-course degradation by human serum enzymes and the increase on glycine aminoacids in the spacer improved the molecular markers stability, as long as the replacement of terminal Met by Nle. HPLC and log P results confirmed the theoretical log P data which showed that the BBN derivatives present low lipophilicity, which decreases with the increase on glycine aminoacids in the spacer and the replacement of terminal Met by Nle. *In vivo* studies demonstrated that ^{111}In -DTPA-BBN analogues present fast blood clearance, excretion by renal pathway and low abdominal accumulation. Highest tumour uptake was observed with the Nle-terminal derivative (YG₅N), which was used for the comparison between the DTPA and DOTA chelators. DOTA-YG₅N was also radiolabeled with ^{111}In at high specific activity ($100\text{ GBq}/\mu\text{mol}$), but this was lower than for the DTPA derivatives. Saturation binding assays on prostate (PC-3 e LNCaP) and breast (T-47D) tumour cells showed similar affinity for the radiopeptide conjugated to DTPA and DOTA, higher binding of DOTA-peptide to PC-3 and LNCaP cells was observed, but not for T-47D cells. This molecular marker was also more internalized by PC-3 cells. *In vivo* studies showed higher stability for ^{111}In -DOTA-YG₅N in mice serum, and the uptake of DTPA and DOTA peptide was similar by PC-3 and LNCaP tumour, although this last tumour has shown 2-fold less BB₂ receptors than PC-3. SPECT/CT imaging of PC-3 and LNCaP was possible with both radiopeptides. When compared to ^{111}In -BZH3, the molecular markers present similar tumour uptake, but with more favorable images, because of their lower abdominal uptake. DOTA-YG₅N was radiolabeled with ^{68}Ga with high radiochemical purity and the biodistribution profile was similar to the peptide labeled with ^{111}In , with significative PC-3 tumour uptake. Toxicological studies showed the bombesin derivatives are safe up to concentration administered and did not present hematological, hepatic or renal toxicity. The BBN derivative YG₅N conjugated to DTPA or DOTA is a promising and safe tool for BB₂ expressing tumour diagnosis by SPECT and PET.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	41
3.1 IMAGEM MOLECULAR EM ONCOLOGIA.....	41
3.1.1 <i>Medicina nuclear e radiofarmácia</i>	43
3.1.2 <i>Instrumentação em medicina nuclear e suas aplicações em oncologia</i>	44
3.1.2.1 Gama-câmaras planares	45
3.1.2.2 Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)	45
3.1.2.3 Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET)	46
3.2 PEPTÍDEOS RADIOMARCADOS PARA IMAGEM MOLECULAR DE TUMORES POR MEDICINA NUCLEAR	48
3.3 BOMBESINA	49
3.3.1 <i>Derivados da bombesina radiomarcados para diagnóstico de tumores</i>	51
3.3.1.1 Derivados da bombesina para SPECT	53
3.3.1.2 Derivados da bombesina para PET	57
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	60
4.1 DERIVADOS DA BOMBESINA.....	60
4.2 RESUMO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	61
5 ESTUDOS COMPUTACIONAIS.....	66
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	67
5.2.1 <i>Materiais</i>	67
5.2.2.1 Construção das estruturas	67

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
5.3.1 Construção das estruturas	68
5.3.3 Cálculo do coeficiente de distribuição (<i>log D</i>)	76
5.4 CONCLUSÕES	77
6 MARCADORES MOLECULARES PARA SPECT: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE ESPAÇADORES.....	78
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	78
6.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA.....	79
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS	86
6.3.1 Infraestrutura	86
6.3.2 Materiais.....	86
6.3.2.1 Reagentes	86
6.3.2.2 Equipamentos, materiais e sistemas	87
6.3.2.3 Tampões e soluções.....	88
6.3.2.4 Animais	88
6.3.3 Métodos	88
6.3.3.1 Metodologias analíticas.....	88
6.3.3.2 Desenvolvimento do método de radiomarcção dos derivados da bombesina com índio-111	89
6.3.3.3 Radiomarcção dos derivados da bombesina com ¹¹¹ In.....	91
6.3.3.4 Análise da estabilidade dos marcadores moleculares	91
6.3.3.5 Determinação do coeficiente de partição (<i>log P</i>) experimental dos marcadores moleculares	92
6.3.3.6 Estudos farmacocinéticos em camundongos <i>BALB/c</i> sadios	93
6.3.3.7 Estudos de biodistribuição em camundongos <i>BALB/c</i> sadios	94
6.3.3.8 Estudos de corpo inteiro em camundongos <i>BALB/c</i> sadios.....	94
6.3.3.9 Cultivo celular.....	95
6.3.3.10 Estudos de biodistribuição em camundongos <i>Nude</i> com tumor PC-3	95
6.3.3.11 Análise estatística	95
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	96

6.4.1 Desenvolvimento do método de radiomarcção dos derivados da bombesina com ^{111}In	96
6.4.1.1 Determinação da temperatura, massa, tempo e atividade de reação	96
6.4.1.2 Avaliação da oxidação da metionina	102
6.4.2 Radiomarcção dos derivados da bombesina com ^{111}In	105
6.4.3 Análise da estabilidade dos marcadores moleculares	106
6.4.3.1 Análise da integridade dos peptídeos após a marcação	106
6.4.3.2 Análise da estabilidade frente à radiólise: efeito dos agentes estabilizantes	111
6.4.3.3 Análise da estabilidade em soro humano <i>in vitro</i>	118
6.4.4 Determinação do coeficiente de partição experimental dos marcadores moleculares ($\log P$).....	124
6.4.5 Estudos farmacocinéticos em camundongos BALB/c sadios	125
6.4.6 Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios	126
6.4.7 Estudos de corpo inteiro em camundongos BALB/c sadios	129
6.4.8 Estudos de biodistribuição em camundongos Nude com tumor PC-3.....	131
6.5 CONCLUSÕES	133
7 MARCADORES MOLECULARES PARA SPECT: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE QUELANTES BIFUNCIONAIS	134
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	134
7.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA.....	135
7.3 MATERIAIS E MÉTODOS	138
7.3.1 Infraestrutura	138
7.3.2 Materiais.....	138
7.3.2.1 Reagentes	138
7.3.2.2 Equipamentos, materiais e sistemas	139
7.3.2.3 Tampões e soluções.....	140
7.3.2.4 Animais	141
7.3.3 Métodos	141
7.3.3.1 Metodologias analíticas.....	141
7.3.3.2 Radiomarcção do peptídeo conjugado ao DTPA e ao DOTA com ^{111}In	141

7.3.3.3 Cultivo celular.....	142
7.3.3.4 Estudos <i>in vitro</i>	143
7.3.3.5 Estudos <i>in vivo</i>	147
7.3.3.6 Análise estatística	149
7.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	150
7.4.1 Radiomarcção do peptídeo conjugado ao DTPA e ao DOTA com ¹¹¹ In	150
7.4.2 Estudos <i>in vitro</i>	151
7.4.2.1 Western Blot	151
7.4.2.2 Ensaio de ligação específica	152
7.4.2.3 Ensaio de saturação	153
7.4.2.4 Internalização e efluxo	156
7.4.2.5 Análise da estabilidade em plasma de camundongo <i>in vitro</i>	158
7.4.3 Estudos <i>in vivo</i>	161
7.4.3.1 Estudo de saturação e competição <i>in vivo</i> em camundongos com tumor de células PC-3	161
7.4.3.2 Estudos imagem, quantificação por imagem e biodistribuição em camundongos com tumor de células PC-3 ou LNCaP	162
7.4.3.3 Estudos de estabilidade <i>in vivo</i>	171
7.5 CONCLUSÕES	174
8 MARCADORES MOLECULARES PARA PET	175
8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	175
8.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA	176
8.3 MATERIAIS E MÉTODOS	178
8.3.1 Infraestrutura	178
8.3.2 Materiais.....	179
8.3.2.1 Reagentes	179
8.3.2.2 Equipamentos, materiais e sistemas	179
8.3.2.3 Tampões e soluções.....	179
8.3.2.4 Animais	180
8.3.3 Métodos.....	180
8.3.3.1 Metodologias analíticas.....	180

8.3.3.2 Desenvolvimento de método de marcação do YG ₅ N-DOTA com ⁶⁸ Ga	181
8.3.3.3 Purificação do marcador molecular	181
8.3.3.4 Síntese automatizada do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga	181
8.3.3.5 Análise da estabilidade do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga	183
8.3.3.6 Cultivo celular.....	184
8.3.3.7 Estudos de biodistribuição em camundongos <i>BALB/c</i> sadios e <i>Nude</i> com tumor PC-3	184
8.3.3.8 Análise estatística	184
8.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	184
8.4.1 Desenvolvimento de método de marcação do YG ₅ N-DOTA com ⁶⁸ Ga	184
8.4.2 Síntese automatizada do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga	193
8.4.3 Análise da estabilidade do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga	194
8.4.4 Estudos de biodistribuição em camundongos <i>BALB/c</i> sadios e <i>Nude</i> com tumor PC-3	195
8.5 CONCLUSÕES	198
9 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	199
9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	199
9.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA.....	199
9.3 MATERIAIS E MÉTODOS	201
9.3.1 Infraestrutura	201
9.3.2 Materiais.....	201
9.3.2.1 Reagentes	201
9.3.2.2 Equipamentos e sistemas.....	201
9.3.2.3 Tampões e soluções.....	201
9.3.2.4 Animais	202
9.3.3 Métodos	202
9.3.3.1 Estudos toxicológicos	202
9.3.3.2 Análise estatística	203
9.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	203
9.5 CONCLUSÕES	213

10 CONCLUSÕES	214
10.1 MARCADORES MOLECULARES PARA APLICAÇÃO EM SPECT	214
10.2 MARCADORES MOLECULARES PARA APLICAÇÃO EM PET	215
10.3 APLICABILIDADE DOS MARCADORES MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE TUMORES EM HUMANOS	215
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	216

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Energia do fóton e meia-vida de diferentes radioisótopos emissores gama ³²	46
TABELA 2 – Energia do pósitron e alcance nos tecidos de diferentes radioisótopos emissores ³¹	47
TABELA 3 – Peptídeos regulatórios avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos ⁷	49
TABELA 4 – Sequência de aminoácidos da bombesina nativa (14 aminoácidos) e dos seus derivados estudados neste trabalho.....	61
TABELA 5 – Coeficientes de partição (log P) e coeficiente de distribuição (log D) no ponto isoelétrico dos derivados da bombesina calculados através do programa MarvinSketch.	72
TABELA 6 – Coeficiente de distribuição (log D) dos derivados da bombesina de acordo com o pH do meio em que se encontram.	77
TABELA 7 – Sequência de aminoácidos dos análogos da bombesina estudados por Shroeder e colaboradores ⁶⁰	84
TABELA 8 – Variação da pureza radioquímica das reações (CCD) em função da temperatura em que 10 µg de DTPA-YG ₅ e 18-22 MBq de ¹¹¹ InCl ₃ reagiram por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm e em pH 4,5 (n = 2).	96
TABELA 9 – Variação da pureza radioquímica das reações (CCD) em função do tempo em que 10 µg de DTPA-YG ₅ e 18,5 MBq de ¹¹¹ InCl ₃ reagiram a 25 °C, sob agitação de 350 rpm e em pH 4,5 (n = 2).	98
TABELA 10 – Efeito da atividade crescente de radionuclídeo sobre a pureza radioquímica da reação de marcação do YG ₅ -DTPA com ¹¹¹ InCl ₃	99
TABELA 11 – Variação da pureza radioquímica das reações (CCD) em função da presença de metionina na reação padrão de marcação do YG ₅ -DTPA (n = 3).103	

TABELA 12 – Pureza radioquímica após a radiomarcagem dos derivados da bombesina nas condições padrão de marcação (174 GBq/μmol; n = 6). A pureza radioquímica foi analisada por CCD.....	105
TABELA 13 – Tempos de retenção do cloreto de índio-111, dos derivados da bombesina não radiomarcados e dos marcadores moleculares em CLAE utilizando o método B (n = 3). Os tempos de retenção apresentados correspondem à espécie principal nos cromatogramas.	109
TABELA 14 – Estabilidade dos marcadores moleculares após armazenamento à temperatura ambiente, determinada por CCD (n = 3).....	112
TABELA 15 – Estabilidade dos marcadores moleculares após armazenamento à temperatura ambiente (n = 3), determinada por CLAE.	113
TABELA 16 – Estabilidade dos marcadores moleculares em soro humano <i>in vitro</i> a 37 °C, determinado por CCD (n = 4) e CLAE (n = 2).....	118
TABELA 17 – Ligação dos marcadores moleculares derivados da bombesina às proteínas séricas <i>in vitro</i> (n = 2).	124
TABELA 18 – Coeficiente de partição (log P) óleo:água (n-octanol:PBS) experimental dos marcadores moleculares derivados da bombesina (n = 6).	124
TABELA 19 – Parâmetros farmacocinéticos para os marcadores moleculares de ¹¹¹ In determinados em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios (n = 5). Os parâmetros foram calculados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00, após o ajuste para decaimento exponencial em duas fases e cálculo da área sob as curvas.	126
TABELA 20 – Biodistribuição dos marcadores moleculares (1,85 MBq, 50 μCi, 0,01 nmol) em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios (n=5).	128
TABELA 21 – Parâmetros de corpo inteiro para os marcadores moleculares de ¹¹¹ In determinados em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios (n = 5). Os parâmetros foram calculados utilizando o GraphPad Prism® 5.00, após o ajuste para decaimento exponencial em uma fase.	130
TABELA 22 – Biodistribuição dos marcadores moleculares (1,85 MBq, 50 μCi, 0,01 nmol) em camundongos <i>Nude</i> implantados com adenocarcinoma de próstata humano por via subcutânea (n = 3).....	132

TABELA 23 – Parâmetros de ligação dos marcadores moleculares às células LNCaP, PC-3 e T-47D após ajuste das curvas de saturação por regressão não-linear (n = 3).	155
TABELA 24 – Estabilidade e ligação às proteínas dos marcadores moleculares em plasma de camundongos <i>BALB/c in vitro</i> a 37 °C, determinado por CLAE.	159
TABELA 25 – Biodistribuição do YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor subcutâneo de células PC-3 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de diferentes massas de marcador molecular e na ausência e presença de bloqueador (25 nmol do YG ₅ N-DOTA).....	162
TABELA 26 – Quantificação da captação tumoral do YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In e YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In e do BZH3- ¹¹¹ In utilizando as imagens SPECT e o CT como referência (InVivoScope, Bioscan, Inc.) (n = 3).....	167
TABELA 27 – Biodistribuição do YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In e YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In e do BZH3- ¹¹¹ In em camundongos <i>beige SCID</i> machos com tumor subcutâneo de células PC-3 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0.13 nmol (13 MBq, 350 µCi) de cada peptídeo radiomarcado (n = 3).....	168
TABELA 28 – Biodistribuição do YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In e YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In e do BZH3- ¹¹¹ In em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor subcutâneo de células LNCaP 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0.13 nmol (13 MBq, 350 µCi) de cada peptídeo radiomarcado (n = 3).	169
TABELA 29 – Estabilidade e ligação às proteínas dos marcadores moleculares em soro de camundongos <i>BALB/c in vivo</i> 5 e 15 minutos após a administração, determinado por CLAE.....	172
TABELA 30 – Estabilidade dos marcadores moleculares e do BZH3- ¹¹¹ In no tumor de células PC-3 e em tecidos de camundongos <i>SCID in vivo</i> 1 hora após a administração, determinado por CLAE. Dado: C = camundongo.	173
TABELA 31 – Pureza radioquímica do YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga determinada por CCD e CLAE após diferentes massas de YG ₅ -DOTA reagirem com 185 MBq de ⁶⁸ GaCl ₃ por 30 minutos, 95 °C e pH 4,0 (n = 2).	185
TABELA 32 – Pureza radioquímica do YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga determinada por CCD e CLAE após 60 µg de YG ₅ -DOTA reagirem com diferentes atividades de ⁶⁸ GaCl ₃ por 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0 (n = 3).	187

TABELA 33 – Pureza radioquímica do YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga determinada por CCD e CLAE após 60 µg de YG ₅ -DOTA reagirem 740 MBq (20 mCi) de ⁶⁸ GaCl ₃ por 8, 15 ou 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0 (n = 3).	189
TABELA 34 – Resultados da síntese automatizada do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga na ausência e presença de etanol 5 % v/v no meio de reação (n = 2).	193
TABELA 35 – Biodistribuição do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga em camundongos <i>BALB/c</i> machos 1 e 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0,3 nmol (11 MBq) do marcador molecular (n = 5).	196
TABELA 36 – Biodistribuição do YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga em camundongos <i>Nude</i> machos com tumor subcutâneo de células PC-3, 1 e 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0,3 nmol (11 MBq) do marcador molecular (n = 5).	197
TABELA 37 – Índices hematimétricos dos animais controles e tratados 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG ₅ -DTPA e YG ₅ N-DTPA (n = 5). Dados: VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média.	206
TABELA 38 – Localização, atividade biológica e dano indicado pelos marcadores séricos de função hepática utilizados nesse trabalho para monitorar os animais controle e tratados com os derivados da bombesina ¹²¹	208
TABELA 39 – Parâmetros séricos de função renal dos animais controle e tratados com YG ₅ -DTPA e YG ₅ N-DTPA (200 µg/kg) 24 horas, 7 e 14 dias após a administração por via endovenosa (n = 5).	210
TABELA 40 – Outros parâmetros séricos dos animais controle e tratados com YG ₅ -DTPA e YG ₅ N-DTPA (200 µg/kg) 14 dias após a administração (n = 5).	211

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Sequência de 10 aminoácidos dos grupamentos C-terminal da bombesina, do peptídeo liberador de gastrina (GRP) e da neuromedina B (NMB).	37
FIGURA 2 – Estrutura da bombesina. A sequência de aminoácidos descrita por Anastasi e colaboradores ⁸ foi utilizada para construção da estrutura através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	50
FIGURA 3 – Derivados da bombesina com diferentes tipos de espaçadores e ligados ao agente quelante N_3S^{53}	55
FIGURA 4 – Estrutura do AMBA- $^{177}Lu^{61}$	56
FIGURA 5 – Esquema do delineamento experimental da primeira etapa do trabalho.	62
FIGURA 6 – Estrutura do derivado da bombesina BZH3 ¹⁴	63
FIGURA 7 – Esquema do delineamento experimental da segunda etapa do trabalho.	64
FIGURA 8 – Esquema do delineamento experimental da terceira etapa do trabalho.	65
FIGURA 9 – Estrutura do agente quelante DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	68
FIGURA 10 – Estrutura do agente quelante DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	69
FIGURA 11 – Estrutura do YG ₃ -DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	69
FIGURA 12 – Estrutura do YG ₃ -DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	69
FIGURA 13 – Estrutura do YG ₅ -DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	70
FIGURA 14 – Estrutura do YG ₅ -DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	70
FIGURA 15 – Estrutura do YG ₅ N-DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).	70

FIGURA 16 – Estrutura do YG ₅ N-DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).....	70
FIGURA 17 – Estrutura do BZH3. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).....	71
FIGURA 18 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG ₃ -DTPA.....	73
FIGURA 19 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG ₃ -DOTA.....	73
FIGURA 20 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG ₅ -DTPA.....	74
FIGURA 21 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG ₅ -DOTA.....	74
FIGURA 22 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG ₅ N-DTPA.....	75
FIGURA 23 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG ₅ N-DOTA.....	75
FIGURA 24 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do BZH3.....	76
FIGURA 25 – Derivados da bombesina radiomarcados com índio-111 e estudados por Visser e colaboradores ⁸¹ . Dados: Acp = 1-aminoetil,4-carboximetil-piperazina; Tha = β-(2-Tienil)-alanina; ACMPip = 4-amino-carboximetilpiperidina; Dpr = ácido 1,2-diaminopropiônico; βAla = β-alanina.....	81
FIGURA 26 – Derivados da bombesina radiomarcados com índio-111 por Garrison e colaboradores ¹⁸	82
FIGURA 27 – Antagonista (RM1) e agonista (AMBA) da bombesina estudados por Mansi e colaboradores ⁸⁴	83
FIGURA 28 – Estrutura do antagonista da bombesina RM2 ⁸⁷	85
FIGURA 29 – Variação da pureza radioquímica da reação de marcação de acordo com a massa de peptídeo que reagiu com 18,5 MBq de ¹¹¹ InCl ₃ , por 30 minutos, a 25° C e agitação de 350 rpm (n = 3).	97

FIGURA 30 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In de atividade específica 3,5 (A); 6,9 (B); 13,9 (C ₁ e C ₂); 20,9 (D ₁ e D ₂); 27,8 (E); 34,8 (F) e 55,6 GBq/μmol (G) e do ¹¹¹ InCl ₃ (H) em CLAE, utilizando-se uma coluna C ₁₈ e o método A. Os números 1 e 2, ao lado de algumas das letras na figura, indicam cromatogramas obtidos em dias diferentes.	101
FIGURA 31 – Perfil de CLAE (UV) do derivado da bombesina YG ₅ -DTPA em uma coluna de fase reversa C ₁₈ , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH ₃ CN (1:1000 v/v) em TFA:H ₂ O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. O tempo de retenção do peptídeo foi 6,55 minutos.	102
FIGURA 32 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 μm; método A) representativo do marcador molecular YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (atividade específica 174 GBq/μmol) obtido na ausência (A) e na presença de 0,5 (B) e 5 mg/mL (C) de metionina no meio de reação.	104
FIGURA 33 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 μm; método B) dos marcadores moleculares YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In (A e B), YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (C e D) e YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In (E e F) obtidos na ausência (A, C e E) e na presença de 0,5 mg/mL de metionina (B, D e F) no meio de reação. Os números indicados na figura correspondem ao tempo de retenção, em minutos, da espécie representada pelo pico correspondente.	107
FIGURA 34 – Perfil de CLAE dos derivados da bombesina YG ₃ -DTPA (A), YG ₅ -DTPA (B) e YG ₅ N-DTPA (C), utilizando-se uma coluna C ₁₈ , com um gradiente linear de 10 a 40 % de TFA:CH ₃ CN (1:1000 v/v) em TFA:H ₂ O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,0 mL/minuto por 20 minutos (método B) e sistema de detecção UV.	108
FIGURA 35 – Estrutura do aminoácido glicina.	110
FIGURA 36 – Estrutura do aminoácido tirosina.	110
FIGURA 37 – Estrutura do aminoácido metionina.	111
FIGURA 38 – Estrutura do aminoácido sintético norleucina.	111

FIGURA 39 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In (174 GBq/μmol) após armazenamento em solução salina (concentração final 370 MBq/mL) à temperatura ambiente por diferentes tempos na ausência de estabilizante (A) ou na presença de metionina da reação (B), ácido ascórbico 10 mg/mL (C), etanol 10 % v/v (D) ou ácido gentísico 10 mg/mL (E) no meio de reação.	114
FIGURA 40 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (174 GBq/μmol) após armazenamento em solução salina (concentração final 370 MBq/mL) à temperatura ambiente por diferentes tempos na ausência de estabilizante (A) ou na presença de metionina da reação (B), ácido ascórbico 10 mg/mL (C), etanol 10 % v/v (D) ou ácido gentísico 10 mg/mL (E) no meio de reação.	115
FIGURA 41 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In (174 GBq/μmol) após armazenamento em solução salina (concentração final 370 MBq/mL) à temperatura ambiente por diferentes tempos na ausência de estabilizante (A) ou na presença de metionina da reação (B), ácido ascórbico 10 mg/mL (C), etanol 10 % v/v (D) ou ácido gentísico 10 mg/mL (E) no meio de reação.	116
FIGURA 42 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 μm; método B) representativo do YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In (174 GBq/μmol) após incubação em soro humano por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D).	120
FIGURA 43 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 μm; método B) representativo do YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (174 GBq/μmol) após incubação em soro humano por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D).	121
FIGURA 44 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 μm; método B) representativo do YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In (174 GBq/μmol) após incubação em soro humano por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D).	122
FIGURA 45 – Curva de clareamento sanguíneo dos marcadores moleculares em camundongos <i>BALB/c</i> (n = 5).	125
FIGURA 46 – Cinética de corpo inteiro dos marcadores moleculares em camundongos <i>BALB/c</i> (n = 5).	130

FIGURA 47 – Exemplos de derivados do DTPA, DOTA e NOTA que podem ser utilizados para marcação de moléculas com $^{111}\text{In}^{102}$	135
FIGURA 48 – Perfil de CLAE representativo (radioativo; coluna C ₁₈ 250 mm x 4,6 mm, 5 µm) dos marcadores moleculares YG ₅ N-DTPA- ^{111}In (174 GBq/µmol, A) e YG ₅ N-DOTA- ^{111}In (100 GBq/µmol, B). Os tempos de retenção do YG ₅ N-DTPA- ^{111}In e do YG ₅ N-DOTA- ^{111}In nesse sistema foram $17,79 \pm 0,1$ e $17,84 \pm 0,1$ minutos, respectivamente.	151
FIGURA 49 – Western blot para BB ₂ , demonstrando que todas as linhagens celulares analisadas expressam o receptor. O resultado é representativo de três experimentos.....	152
FIGURA 50 – Ligação do marcador molecular YG ₅ N-DOTA- ^{111}In às células de tumor de próstata (PC-3 e LNCaP) e mama (BT-474, MDA-MB-231 e T-47D) humanos. O aumento na ligação total e específica com o aumento no número de células sugere ligação ao receptor (n = 3).	153
FIGURA 51 – Curvas representativas da saturação da ligação dos marcadores moleculares YG ₅ N-DTPA- ^{111}In (esquerda) e YG ₅ N-DOTA- ^{111}In (direita) às células LNCaP, PC-3 e T-47D. Dado: rec/cel = receptores por célula.	154
FIGURA 52 – Fração internalizada dos marcadores moleculares e ligada à membrana das células PC-3 em função do tempo de incubação a 37 °C e 5 % de CO ₂	156
FIGURA 53 – Perfil de internalização (em porcentagem do total adicionado por miligrama de proteína) em função do tempo de incubação dos marcadores moleculares conjugados ao DTPA e ao DOTA em células PC-3 (n = 3).	157
FIGURA 54 – Efluxo (em porcentagem do total internalizado) em função do tempo após 60 minutos de internalização dos marcadores moleculares conjugados ao DTPA e ao DOTA em células PC-3 (n = 3).	158
FIGURA 55 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 µm; método B da seção 6.3.3.1) representativo do YG ₅ N-DTPA- ^{111}In (A, B, C e D) e do YG ₅ N-DOTA- ^{111}In (E, F, G e H) após incubação em soro de camundongo por 15 minutos (A e E), 1 hora (B e F), 4 horas (C e G) e 24 horas (D e H).	160

FIGURA 56 – Imagens SPECT/CT de camundongos <i>beige SCID</i> machos com tumor de células PC-3 (indicado pelas setas brancas) utilizando os marcadores moleculares YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In, YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In e o derivado da bombesina BZH3- ¹¹¹ In. As imagens são representativas de três.	164
FIGURA 57 – Imagens SPECT/CT de camundongos <i>SCID</i> machos com tumor de células LNCaP no flanco esquerdo (indicado pelas setas brancas) utilizando os marcadores moleculares YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In, YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In e o derivado da bombesina BZH3- ¹¹¹ In. As imagens são representativas de três.	165
FIGURA 58 – Módulo automático Modular-Lab Pharm Tracer utilizado para marcação automatizada do YG ₅ N-DOTA com ⁶⁸ Ga.	182
FIGURA 59 – Cassete para marcação do DOTATATO com ⁶⁸ Ga que foi utilizado para marcação do YG ₅ N-DOTA.	182
FIGURA 60 – Módulo automático montado com o cassete para marcação. Os números indicam a posição do gerador de ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga (1); dos frascos contendo NaCl 0,9 % p/v e etanol 50 % (2); do frasco de reação (3); do frasco do resíduo (4) e do produto final (5).	183
FIGURA 61 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga produzido após a reação de 20 (A); 30 (B); 40 (C); 50 (D); 60 (E) and 70 µg (F) de YG ₅ -DOTA com 185 MBq de ⁶⁸ GaCl ₃ por 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸ GaCl ₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR mais curto que o marcador molecular.	186
FIGURA 62 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga (TR 15,8 ± 0,2 minutos) produzido após a reação 60 µg de YG ₅ -DOTA com 185 (A), 370 (B) e 740 MBq (C) de ⁶⁸ GaCl ₃ por 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸ GaCl ₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR intermediário.	188

FIGURA 63 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga (TR 15,8 ± 0,2 minutos) produzido após a reação 60 µg de YG ₅ -DOTA com 740 MBq de ⁶⁸ GaCl ₃ por 30 (A), 15 (B) e 8 minutos (C), a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸ GaCl ₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR intermediário.	190
FIGURA 64 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG ₅ -DOTA- ⁶⁸ Ga (TR 15,8 ± 0,2 minutos; 28 GBq/µmol) antes e após a purificação produzido após a reação 60 µg do YG ₅ N-DOTA com 740 MBq de ⁶⁸ GaCl ₃ por 8 minutos, a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸ GaCl ₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR intermediário.	192
FIGURA 65 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga (TR 15,6 ± 0,2 minutos) produzido em módulo automatizado na ausência (A) e presença (B) de etanol 5 % v/v no meio de reação.....	194
FIGURA 66 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG ₅ N-DOTA- ⁶⁸ Ga (TR 15,6 ± 0,2 minutos) produzido em módulo automatizado na ausência (A, B e C) e presença (D, E e F) de etanol 5 % v/v no meio de reação imediatamente (A e D) e após 1 (B e E) e 3 (C e F) horas de armazenamento à temperatura ambiente.....	195
FIGURA 67 – Variação do peso e consumo de ração e água dos animais controle (barras cinzas), administrados com solução de NaCl 0,9 %, e tratados com YG ₅ -DTPA (barras vermelhas) e YG ₅ N-DTPA (barras azuis) (200 µg/kg) (n = 5).....	204
FIGURA 68 – Células vermelhas, hemoglobina e hematócrito dos animais controle e tratados 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG ₅ -DTPA (barras vermelhas) e YG ₅ N-DTPA (barras azuis) (n = 5).....	205
FIGURA 69 – Número de células brancas e plaquetas dos animais controle e tratados 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG ₅ -DTPA (barras vermelhas) e YG ₅ N-DTPA (barras azuis) 200 µg/kg (n = 5).....	207

FIGURA 70 – Parâmetros séricos de função hepática dos animais controle (barras cinzas) e tratados com YG ₅ -DTPA (barras vermelhas) ou YG ₅ N-DTPA (barras azuis) (200 µg/kg) (n = 5). DADOS: ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FA – fosfatase alcalina.	209
FIGURA 71 – Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado, rim e pâncreas após coloração com hematoxilina/eosina dos animais controle e tratados com YG ₅ -DTPA ou YG ₅ N-DTPA 24 horas após a administração endovenosa.	212
FIGURA 72 – Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado, rim e pâncreas após coloração com hematoxilina/eosina dos animais controle e tratados com YG ₅ -DTPA ou YG ₅ N-DTPA 7 dias após a administração endovenosa.	212
FIGURA 73 – Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado, rim e pâncreas após coloração com hematoxilina/eosina dos animais controle e tratados com YG ₅ -DTPA ou YG ₅ N-DTPA 14 dias após a administração endovenosa.	213

LISTA DE ABREVIATURAS

% AI	Porcentagem de atividade injetada
% AI/g	Porcentagem de atividade injetada por grama de tecido
μCi	Micro currie
μg	Micrograma
μL	Micro litro
μMol	Micromol
¹¹¹In	Radioisótopo de índio com número de massa 111
¹¹²Cd	Isótopo de cádmio com número de massa 112
^{114m}In	Radioisótopo de índio metaestável com número de massa 114
11-Aun	Ácido 11-aminoundecanóico
¹²³I	Radioisótopo de iodo com número de massa 123
¹³¹I	Radioisótopo de iodo com número de massa 131
¹⁷⁷Lu	Radioisótopo de lutécio com número de massa 177
¹⁸F	Radioisótopo de flúor com número de massa 18
²⁰¹Tl	Radioisótopo de tálio com número de massa 201
²¹³Bi	Radioisótopo de bismuto com número de massa 213
2D	Duas dimensões
5-Ava	Ácido 5-aminovalérico
⁶⁴Cu	Radioisótopo de cobre com número de massa 64
⁶⁵Zn	Radioisótopo de zinco com número de massa 64
⁶⁷Ga	Radioisótopo de gálio com número de massa 67
⁶⁸Ga	Radioisótopo de gálio com número de massa 68
⁶⁸Ge	Radioisótopo de germânio com número de massa 68
6-Ahx	Ácido 6-aminohexanóico
8-Aoc	Ácido 8-aminooctanóico
⁹⁰Y	Radioisótopo de ítrio com número de massa 90
^{99m}Tc	Radioisótopo de tecnécio metaestável com número de massa 99

9-Anc	Ácido 9-aminononanóico
aCMpip	4-amino-carboximetilpiperidina
AI	Atividade injetada
Al	Alumínio
Ala	Alanina
ALT	Alanina-aminotransferase
AMBA	CH ₂ CO-Gly-4-aminobenzoil-BBN(7-14)-DO3A
AMP	Monofosfato de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AST	Aspartato-aminotransferase
AUC	Área sob a curva
BB₁	Receptor para bombesina com alta afinidade para NMB
BB₂	Receptor para bombesina com alta afinidade para GRP
BB₃	Receptor órfão para bombesina
BB₄	Receptor para bombesina encontrado apenas em anfíbios
BBN	Bombesina; pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met
BBN(6-14)	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met
Bi	Bismuto
Bmax	Número máximo de receptores para cada marcador molecular em cada célula
Bq	Bequerel
BSA	Soroalbumina bovina
BT-474	Carcinoma ductal primário de mama humano
BzDig	Ácido p-aminobenzildiglicólico
BZH1	GABA-[D-Tyr ⁶ , b-Ala ¹¹ , Thi ¹³ ; Nle ¹⁴]-BBN(6-14)-DTPA
BZH2	GABA-[D-Tyr ⁶ , b-Ala ¹¹ , Thi ¹³ ; Nle ¹⁴]-BBN(6-14)-DOTA
C	Carbono
CA	Califórnia
CB	Centro de Biotecnologia

CCD	Cromatografia de camada delgada
Cd	Cadmio
Cel	Célula
CH₃CN	Acetonitrila
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl	Cloro
CL	Depuração
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Coeficiente de partição
cpm	Contagens por minuto
CT	Tomografia computadorizada
Cu	Cobre
Ci	Currie
Cys	Cisteína
Demobesin-1	BzDig-[DPhe ¹ ,Leu-NHET ¹³]BBN(6-13)-N ₄
DIRF	Diretoria de radiofarmácia
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO2A	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4-diacético
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético
DTMA	Ácido 2-N,N'-Bis-terc-butoxicarbonil-dietilenotriaminoacético
DTPA	Ácido dietileno-triamino-pentacético
EDDA	Ácido etilenodiaminodiacético
EMEA	European Medicines Agency
EQ	Equação
F	Fluor
FA	Fosfatase alcalina
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluordesoxiglicose
FIG	Figura
fm³	Fentometros cúbicos (10 ⁻¹⁵ m ³)
fmol	Fentomol (10 ⁻¹⁵ mol)

FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
<i>g</i>	Força centrífuga
g	Grama
Ga	Gálio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GBq	Gigabecquerel
Ge	Germânio
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly, G	Glicina
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
H	Hidrogênio
h	Horas
H₂O	Água
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCl	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazinaetanosulfônico
His	Histidina
HIV/AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
HYNIC	Ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico
I	Iodo
In	Índio
Inc	Incorporation
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Kd	Constante de dissociação
Kel	Constante de eliminação do organismo
KeV	Kilo eletrovolt
Kg	Kilograma
L	Litros
Leu	Leucina

LNCaP	Células de carcinoma prostático humano
Log	Logarítmo
log D	Coeficiente de distribuição
log P	Coeficiente de partição
LP	Proteínas plasmáticas
Lu	Lutécio
Lys	Lisina
M	Molar
MBq.mol⁻¹	Mega Becquerel por mol
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano
MDP	Metilenodifosfonato
MES	Ácido 2-(N-morflino)ethanosulfônico
Met	Metionina
mg	Miligrama
MIBG	Metaiodobenzilguanidina
MIBI	Sestamibi
min	Minutos
MP2346	[Pro ¹ ,Tyr ⁴]BBN
MP2653	[aCMpip ⁵ ,Tha ^{6,13} ,Nle ¹⁴]BBN(6-14)-DTPA
MRI	Ressonância magnética
n	Número
N₃S	Dimetilglicil-L-seril-L-cisteinilglicinamida
PEG	Polietilenoglicol
N₄	6-R-1,4,8,11-tetraazaundecano
Na	Sódio
NaI	Iodeto de sódio
nd	Não determinado
NETs	Tumores neuroendócrinos
Nle	Norleucina
NMB	Neuromedina B
nmol	Nanomol
NO₂A	Ácido 1,1,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético

NOTA	Ácido 1,1,7-triazaciclononano-1,4-diacético
OMS	Organização Mundial de Saúde
P₂S₂	Ditio-hidroximetil-bifosfino
PBS	Tampão fosfato-salina
PC-3	Adenocarcinoma prostático humano grau IV
PEG	Polietilenoglicol
Pesin	dPEG ₄ -BBN(6-14)-DOTA
PET	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Q	Quelante
R_f	Fator de retenção
RM1	CH ₂ CO-Gly-4-aminobenzoil-[Sta ¹³ ,Leu ¹⁴]BBN(7-14)-DO3A
RM2	4-amino-1-carboximetil-piperidina-[Sta ¹³ ,Leu ¹⁴]BBN(7-14)-DOTA
rpm	Rotações por minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
t_½	Meia vida
t_{½α}	Meia-vida de distribuição
t_{½β}	Meia-vida de eliminação
T47-D	Carcinoma ductal metastático humano
TAB	Tabela
Tc	Tecnécio
TE2A	Ácido 1,4,8,1-tetraazaciclotetradecano-1,4-diacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TETA	Ácido 1,4,8,1-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetracético
TFA	Ácido trifluoroacético
Tha	β-(2-tienil)-alanina
Tha	β-(2-tienil)-alanina

Thr	Treonina
Tl	Tálio
TLC-SG	Suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada
TR	Tempo de retenção
Trp	Triptofano
TSH	Hormônio estimulador da função tireoidiana
Tyr, Y	Tirosina
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta
v/v	Volume por volume
Val	Valina
VCM	Volume corpuscular médio
Vd	Volume de distribuição
YG₃	Tyr-(Gly) ₃ -Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
YG₅	Tyr-(Gly) ₅ -Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
YG₅N	Tyr-(Gly) ₅ -Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Nle-NH ₂
Zn	Zinco
Zr	Zircônio
β	Constante de eliminação
α	Constante de distribuição

1

INTRODUÇÃO

A medicina nuclear é a área médica que utiliza compostos radioativos, ou radiofármacos, para fins diagnósticos e terapêuticos¹. Os radiofármacos, por sua vez, consistem na combinação de um componente químico “frio” (não radioativo) e um radioisótopo. Este é responsável pela aplicação diagnóstica e/ou terapêutica do radiofármaco². Já o componente químico é geralmente responsável pelo comportamento fisiológico do radiofármaco e por sua ligação aos órgãos-alvo.

A escolha do radioisótopo mais apropriado para a produção de radiofármacos para diagnóstico ou terapia de doenças depende de suas propriedades físicas e químicas, bem como de fatores biológicos que determinam sua distribuição *in vivo*. O tipo de decaimento radioativo influencia diretamente sua aplicabilidade. A emissão de radiação particulada (α , β^- ou elétrons Auger) é desejável para radioisótopos para aplicações terapêuticas. Já a emissão de radiação gama (γ) ou de pósitrons (β^+) é característica de radioisótopos para aplicação em tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de pósitrons (PET), respectivamente³.

Do ponto de vista do comportamento fisiológico, determinado por seu componente químico, os radiofármacos distribuem-se nos órgãos-alvo principalmente por difusão passiva, difusão facilitada, transporte ativo, bloqueio capilar, localização compartimental, fagocitose, ligação antígeno-anticorpo e ligação receptor-específica¹. Considerando-se a aplicação em oncologia, a descoberta de características moleculares intrínsecas das células tumorais levou à tendência de desenvolvimento de componentes

químicos receptor-específicos, dentre os quais destacam-se os peptídeos regulatórios^{4; 5}. Mediante uma revisão da literatura, é possível afirmar que uma grande variedade de peptídeos regulatórios já foi identificada pela comunidade científica por apresentar alta afinidade por determinados receptores, superexpressos em células tumorais. A radiomarcção desses peptídeos oferece a possibilidade de novos compostos com aplicações diagnósticas e terapêuticas de doenças oncológicas por medicina nuclear^{6; 7}. Dentre esses peptídeos, a bombesina (BBN) é um dos que desperta maior interesse.

A BBN é um neuropeptídeo de 14 aminoácidos análogo dos peptídeos humanos liberador de gastrina (GRP) e neuromedina B (NMB), isolada da pele do anfíbio europeu *Bombina bombina* em 1970⁸. A homologia entre os grupamentos C-terminal da BBN, do GRP e da NMB é apresentada na FIG. 1.

Bombesina	Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH₂
GRP	Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH₂
NMB	Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-CONH₂

FIGURA 1 – Sequência de 10 aminoácidos dos grupamentos C-terminal da bombesina, do peptídeo liberador de gastrina (GRP) e da neuromedina B (NMB).

Atualmente, existem três tipos de receptores para bombesina descritos em mamíferos, sendo eles: o receptor BB₁, com alta afinidade para NMB; o receptor BB₂, com alta afinidade para GRP; e o receptor órfão BB₃, assim denominado por se desconhecer seu ligante endógeno. A expressão normal dos receptores BB₂ está limitada a tecidos não neuroendócrinos da mama e do pâncreas e a tecidos neuroendócrinos do trato gastrointestinal, cérebro, próstata e pulmão^{9; 10}.

O interesse em derivados da bombesina radiomarcados para diagnóstico e/ou terapia de tumores tem crescido consideravelmente a partir da observação de que os receptores BB₂ são superexpressos ectopicamente em células de tumores de próstata, mama, cólon e pulmão, além de glioblastomas e neuroblastomas^{6; 11}. Nesses tumores, a ligação aos receptores BB₂ regula a proliferação, a diferenciação e a morfologia celular⁹;

¹⁰ .

Modificações moleculares na estrutura da BBN vêm sendo promovidas com a finalidade de aumentar sua afinidade pelos receptores, especificidade pelas células tumorais e estabilidade *in vivo*. Essas modificações ocorrem principalmente na porção N-terminal da BBN, uma vez que a porção C-terminal é a responsável pela interação com os receptores e atividade biológica do peptídeo^{12; 13}. A porção N-terminal modificada é denominada espaçador e os derivados produzidos podem ser agonistas ou antagonistas dos receptores BB₂ e têm sido radiomarcados com diferentes radioisótopos, tais como gálio-68 (⁶⁸Ga)^{14; 15}, flúor-18 (¹⁸F)¹⁶ e cobre-64 (⁶⁴Cu)¹⁷ para diagnóstico por PET; índio-111 (¹¹¹In)¹⁸ e tecnécio-99m (^{99m}Tc)¹⁹ para diagnóstico por SPECT; e lutécio-177 (¹⁷⁷Lu)²⁰, ítrio-90 (⁹⁰Y)²¹ e bismuto-213 (²¹³Bi)²² para terapia de diversos tipos de tumores.

No entanto, apesar do grande número de derivados agonistas e antagonistas da bombesina desenvolvidos e radiomarcados, um radioligante com características adequadas para aplicação *in vivo*, ou seja, que apresenta o máximo de captação tumoral com o mínimo de acúmulo nos tecidos saudáveis, ainda não foi descrito e seu desenvolvimento constitui-se em contribuição de suma importância para diagnóstico e tratamento de tumores que superexpressam receptores BB₂.

2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a marcação de uma nova série de derivados da bombesina com índio-111 e gálio-68, e caracterizar suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, de modo a obter marcadores moleculares inéditos e avaliar seu potencial para realização de diagnóstico de tumores que superexpressam receptores para o peptídeo liberador de gastrina (BB₂), utilizando técnicas tomográficas como SPECT e PET.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Radiomarcador uma série de derivados da bombesina de diferentes espaçadores com ¹¹¹In para aplicação em SPECT;
- ✓ escolher, dentre os derivados radomarcados com ¹¹¹In, aquele com maior potencial para aplicação *in vivo*;
- ✓ comparar a capacidade do derivado escolhido conjugado aos agentes quelantes DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético) e DTPA (ácido dietileno-triamino-pentacético) e radiomarcado com ¹¹¹In quanto ao potencial de ligação às células tumorais *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ radiomarcador o derivado escolhido e conjugado ao agente quelante mais adequado com ⁶⁸Ga para aplicação em PET, avaliar sua estabilidade e propriedades *in vivo*;

- ✓ avaliar a toxicidade do derivado da bombesina correspondente ao marcador molecular com maior potencial para aplicação *in vivo*;
- ✓ discutir a aplicabilidade do marcador molecular escolhido em SPECT e PET, considerando o espaçador, o agente quelante, suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, bem como sua toxicidade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados os principais temas relacionados a este trabalho, com ênfase na literatura atualizada e em uma abordagem generalizada. Revisões bibliográficas específicas a cada etapa experimental serão abordadas nos capítulos correspondentes.

3.1 IMAGEM MOLECULAR EM ONCOLOGIA

O câncer pode ser entendido como o resultado de proliferações anormais de células que têm crescimento autônomo e tendem a perder sua diferenciação²³. Essas células, denominadas cancerosas, têm propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais variadas. Como sua taxa de multiplicação é elevada (alto índice mitótico), seu crescimento é usualmente rápido e o mesmo não acontece com o estroma e os vasos sanguíneos tumorais, que se desenvolvem mais lentamente, resultando muitas vezes em degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações. Em razão da perda da diferenciação celular, as células malignas apresentam atipias variadas, desde discretas até muito intensas; neste caso perdem seus aspectos morfológicos específicos. As células cancerosas apresentam também alterações importantes da membrana plasmática, que as tornam menos aderentes entre si e facilitam seu deslocamento da colônia neoplásica. Com isso elas podem se movimentar, infiltrar-se em tecidos adjacentes, penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos e, a partir deles, migrar para regiões distantes do organismo e neles originar novos tumores, denominados metástases. A formação de metástases é

um processo complexo que depende de inúmeras interações entre células malignas e componentes do hospedeiro. Dele participam diversos produtos gênicos, sobretudo moléculas de adesão, enzimas hidrolíticas e fatores envolvidos na formação de vasos²⁴.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é responsável por 13 % das mortes anuais, o que excede o total das mortes por síndrome de imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), tuberculose e malária em conjunto²⁵. É a primeira causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. A incidência do câncer vem crescendo nos países em desenvolvimento como resultado do aumento da expectativa de vida da população e da adoção de hábitos relacionados ao desenvolvimento da doença, tais como o tabagismo, o sedentarismo e a dieta inadequada²⁶.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam para a ocorrência de aproximadamente 520 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil novos casos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon, reto e glândula tireóide para o sexo feminino²⁷.

A reativação da expressão de alguns genes pode fazer com que as células cancerosas passem a expressar antígenos não encontrados em células normais do mesmo órgão ou tecido e esses podem ser utilizados como marcadores tumorais para diagnóstico da doença, bem como alvo de fármacos para tratamento ou ainda como alvo para diagnóstico por imagem²⁴.

A imagem médica é baseada na interação da energia com os tecidos biológicos. A natureza da informação disponível em cada modalidade é determinada pela natureza dessas interações. A imagem convencional com os raios X permite a distinção do ar, água, gordura e osso devido ao coeficiente de absorção diferente para cada meio. Na ultrassonografia é a propriedade refletora diferente de cada tecido que serve de base para a construção da imagem. Nas imagens de ressonância magnética é a diferença de quantidade de hidrogênio existente no meio, além da química e física do núcleo de hidrogênio, que fornecem as bases para distinguir os tecidos²⁸.

Imagem molecular é definida como a visualização, caracterização e medida dos processos biológicos em nível molecular e celular em seres humanos e outros sistemas vivos. Geralmente explora características específicas de moléculas radiomarcadas e intrínsecas do tecido alvo como mecanismo de imagem e inclui diversas modalidades de imagem, tais como ressonância magnética, bioluminescência, fluorescência óptica, ultrasonografia, tomografia computadorizada, tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET)²⁹.

As modalidades de imagem podem ser divididas em anatômicas e funcionais, com uma relação inversa entre a resolução espacial e a sensibilidade para detecção de pequenas lesões. As modalidades anatômicas, caracterizadas por alta resolução espacial, incluem a tomografia computadorizada (CT), a ressonância magnética (MRI) e a ultrasonografia. Essas técnicas são limitadas pela incapacidade de detectar lesões até que elas promovam mudanças estruturais significativas que permitam sua detecção. Exceções são os protocolos funcionais de CT e MRI que empregam imagens dinâmicas e com o auxílio de contrastes. Já as imagens funcionais, tais como SPECT e PET, são capazes de detectar as alterações moleculares e celulares decorrentes de uma doença antes que sua extensão seja ampla o suficiente para promover mudanças estruturais no órgão ou tecido em que ocorre, embora apresentem baixa resolução espacial. Sistemas híbridos que combinam duas ou mais modalidades de imagem podem ser utilizados para detectar alterações patofisiológicas nos estágios iniciais de uma doença com alta resolução estrutural. Exemplos são os sistemas SPECT/CT e PET/CT, que reúnem imagem convencional de raios X do CT às técnicas de medicina nuclear SPECT e PET²⁹.

3.1.1 Medicina nuclear e radiofarmácia

Na medicina nuclear a imagem do corpo é obtida de dentro para fora. Os radiotraçadores, geralmente na forma de radiofármacos, são administrados por via endovenosa, aguardando-se a concentração no tecido-alvo antes de adquirir as imagens³⁰. A inferência diagnóstica é obtida gravando-se a distribuição do material radioativo tanto no tempo quanto no espaço. A farmacocinética dos traçadores e a captação seletiva pelos tecidos formam as bases da utilidade diagnóstica²⁸.

A riqueza das aplicações da medicina nuclear reside na diversidade de

radiofármacos disponíveis. A maioria dos radiofármacos é uma combinação de um isótopo radioativo, que permite a detecção externa de uma porção biologicamente ativa, e de um componente químico não radioativo, que é responsável pela biodistribuição. Para alguns agentes, tais como os gases inertes radioativos, os radioiodos (^{131}I , ^{123}I), o gálio-67 (^{67}Ga) na forma de citrato e o tálio-201 (^{201}Tl) na forma de cloreto, são os átomos em sua forma química adequada que possuem as propriedades desejadas para a localização, dispensando assim um componente químico maior²⁸.

Certas características são desejáveis a um radiofármaco. O tipo, a energia e a meia-vida efetiva da emissão radioativa devem ser compatíveis com a aplicação desejada. A atividade específica, ou seja, a radioatividade por unidade de massa deve ser alta. Olhando pela perspectiva do fármaco, as características ideais incluem biodistribuição adequada para atingir o tecido alvo, ausência de toxicidade e efeitos secundários. Os radiofármacos não devem sofrer dissociação *in vitro* nem *in vivo*, ser fáceis de radiomarcador e apresentar disponibilidade a um custo razoável²⁸.

A medicina nuclear permite caracterizar parâmetros funcionais e metabólicos *in vivo* e de forma não invasiva. As informações fornecidas podem auxiliar no raciocínio clínico em várias situações nas quais os métodos de imagem anatômicos são limitados, como, por exemplo, infiltração de pequenos linfonodos ou pesquisa de tumor residual após tratamento. As aplicações diagnósticas da medicina nuclear em oncologia incluem a detecção e caracterização da lesão primária, o estadiamento e o controle da resposta terapêutica³⁰. As instrumentações e aplicações diagnósticas da medicina nuclear serão consideradas detalhadamente a seguir.

3.1.2 Instrumentação em medicina nuclear e suas aplicações em oncologia

Três tipos de câmaras são utilizadas em medicina nuclear: as gama câmaras planares, as câmaras para tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e as câmaras para tomografia por emissão de pósitrons (PET). De um modo geral, os estudos envolvem a aquisição de imagens estáticas ou dinâmicas. As imagens dinâmicas permitem ao clínico visualizar em tempo real o caminho do radioisótopo nos diferentes compartimentos e órgãos do organismo.

3.1.2.1 Gama-câmaras planares

A gama-câmara planar foi o primeiro tipo de equipamento a substituir o cintígrafo retilíneo. Através dela obtém-se uma imagem bidimensional da biodistribuição tridimensional da radioatividade em um determinado órgão. A detecção de lesões pode ser melhorada pela aquisição da imagem em diferentes planos ao redor do paciente, mais comumente em projeções anterior, posterior, oblíqua e lateral direita e esquerda. Entretanto, as imagens obtidas com esse equipamento podem impedir a visualização de lesões mais profundas devido à sobreposição dos tecidos normais na imagem em duas dimensões³¹.

O detector nas gama-câmaras consiste em um cristal de iodeto de sódio (NaI), que detecta a radioatividade proveniente do corpo do paciente e produz eventos de cintilação primários para gerar a imagem. O colimador é um disco posicionado em frente ao cristal de NaI e limita a detecção aos fótons emitidos do paciente em direção ao ângulo de visão do detector. A imagem adquirida é armazenada em um computador para análise posterior e pode ser visualizada através de um monitor. A visualização é útil para o posicionamento do paciente durante a imagem³¹.

3.1.2.2 Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT)

Em um sistema SPECT, o detector gira 360° ao redor do paciente para aquisição de imagens bidimensionais, da mesma forma que nas gama-câmaras planares. A reconstrução da imagem permite a visualização em três planos ortogonais: transversal, sagital e coronal. Fatias eletrônicas de cada órgão são produzidas em cada plano de forma que a distribuição da radioatividade possa ser visualizada em três dimensões. Uma câmara SPECT pode ser utilizada para obtenção de imagens planares ou SPECT³¹.

Da mesma forma que as gama-câmaras planares, a SPECT é utilizada para detecção de radiação gama (γ) característica de radioisótopos, uma vez que os detectores empregados na instrumentação SPECT requerem emissão gama abundante e de energia entre 100 e 300 keV. As câmaras utilizam detectores de NaI e podem ser configuradas com uma, duas ou três cabeças de detecção. A sensibilidade aumenta com o número de cabeças de detecção³¹. Na TAB. 1 apresentam-se os principais radioisótopos utilizados para imagem em gama-câmaras planares e câmaras SPECT, suas meias-vidas e energias dos fótons.

TABELA 1 – Energia do fóton e meia-vida de diferentes radioisótopos emissores gama³².

Radioisótopo	Energia máxima do fóton (keV)	Meia-vida (h)
⁶⁷ Ga	93, 184, 300, 393	78,3
¹¹¹ In	171, 245	67,2
¹²³ I	159	13,2
^{99m} Tc	140	6,0

As câmaras SPECT podem ser conjugadas a um equipamento de tomografia computadorizada (CT), formando o sistema híbrido SPECT/CT. As imagens de cada modalidade são adquiridas sequencialmente, no mesmo procedimento, e então fundidas. Essa modalidade de imagem permite uma importante melhora na interpretação das imagens de medicina nuclear, uma vez que a localização da captação anormal do radiofármaco pode ser precisamente determinada³³.

O ^{99m}Tc é o radioisótopo mais utilizado para procedimentos diagnósticos por SPECT. Entretanto, para imagem de tumores, apenas o MDP-^{99m}Tc (metileno-difosfonato) e o MIBI-^{99m}Tc (sestamibi) são utilizados para diagnóstico de metástases ósseas de tumores e tumores de mama. Além desses, os radiofármacos Octreotídeo-DTPA-¹¹¹In, MIBG-¹²³I (metaiodobenzilguanidina), NaI-¹²³I (iodeto de sódio) e citrato de ⁶⁷Ga são utilizados para diagnósticos de tumores neuroendócrinos, neuroblastomas, carcinoma medular da tireoide e linfoma, respectivamente³⁴. Vale ressaltar que, dentre esses radiofármacos, apenas o Octreotídeo-DTPA-¹¹¹In e o MIBG-¹²³I são receptor-específicos.

3.1.2.3 Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET)

A PET capitaliza a coincidência de dois fótons em direções opostas (180°), ambos com energia de 511 keV e originados da aniquilação das partículas β^+ , para computadorizar uma imagem em três dimensões que apresenta uma melhor resolução em relação à imagem SPECT. Devido à habilidade de localizar a posição em que os dois fótons foram originados, esta técnica apresenta uma alta eficiência de quantificação da radiação no tecido. Em contrapartida, apresenta também um custo maior³.

A colinearidade dos fótons permite a sua detecção simultânea através de

detectores dispostos em direções opostas acoplados a um equipamento de coincidência. Uma vez que apenas fótons de coincidência são detectados, não há necessidade de um colimador para determinar a região de origem do fóton e, por isso, o sistema utiliza a colimação eletrônica. As linhas de resposta (ou de coincidência) são armazenadas em um computador e processadas para gerar imagens da distribuição de atividade em cortes transversais³¹.

A resolução espacial da PET depende do tipo de detector e do radioisótopo utilizado. A energia da partícula β^+ emitida pelo radioisótopo determina a distância que o pósitron percorre no tecido até a aniquilação. Emissores de pósitron de menor energia conferem melhor resolução às imagens³¹. Na TAB. 2 apresentam-se os emissores de pósitrons mais comumente utilizados, suas energias e seus alcances.

TABELA 2 – Energia do pósitron e alcance nos tecidos de diferentes radioisótopos emissores³¹.

Radioisótopo	Energia máxima do pósitron (MeV)	Alcance máximo linear (mm)	Alcance médio linear (mm)
¹¹ C	0,96	5,0	0,3
¹³ N	1,19	5,4	1,4
¹⁵ O	1,72	8,2	1,5
¹⁸ F	0,64	2,4	0,2
⁶⁸ Ga	1,89	9,1	1,9
⁸² Rb	3,35	15,6	2,6

Da mesma forma que anteriormente descrito para as câmaras SPECT, há também sistemas híbridos que combinam a PET ao CT (PET/CT). Sua vantagem é a habilidade de adquirir a imagem anatômica com o CT e, na sequência, a imagem funcional com a PET. Programas computacionais permitem a exata correlação e sobreposição das imagens PET e CT, confirmando se a atividade funcional é associada com a lesão³¹.

O ¹⁸F é o radioisótopo mais utilizado para diagnóstico de tumores por PET³². O radiofármaco fluordesoxiglicose-¹⁸F (FDG-¹⁸F) representou um importante avanço para

imagem PET em oncologia. A FDG-¹⁸F atua como um análogo da glicose e permite a visualização do consumo de glicose, um processo metabólico aumentado em alguns tipos de câncer, como, por exemplo, no linfoma.

3.2 PEPTÍDEOS RADIOMARCADOS PARA IMAGEM MOLECULAR DE TUMORES POR MEDICINA NUCLEAR

O estadiamento do câncer é fundamental para definição do prognóstico e avaliação da resposta à terapia para a maioria dos pacientes. Apesar da sua importância, o estadiamento clínico-patológico da maioria dos cânceres ainda é limitado, e a identificação dos pacientes com maior risco para recorrência ou com maior benefício para um tipo de terapia ainda precisa ser definida para tipos específicos de tumor. As novas tecnologias para avaliar o genoma ou estrutura e função de receptores potencializou o surgimento de novos marcadores tumorais para diagnóstico e alvos terapêuticos com potencial para individualizar a prevenção, a detecção e a cura do câncer³⁵. Um desses novos marcadores são os peptídeos. O interesse em sua utilização para o diagnóstico e terapia de tumores por medicina nuclear vem da descoberta da superexpressão de seus receptores por alguns tipos de tumores³⁶.

Os peptídeos são reguladores do crescimento, da função e da comunicação celular. Eles agem como neurotransmissores, regulando a resposta imune e a tradução de informações. Alguns neurotransmissores, hormônios, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento são peptídeos³⁷.

Os peptídeos apresentam diversas vantagens sobre as proteínas para diagnóstico de tumores por medicina nuclear. Eles são sintetizados facilmente e de acordo com as boas práticas de fabricação, são rapidamente distribuídos e eliminados devido ao seu pequeno peso molecular; apresentam baixo potencial para ativação de respostas imunológicas e conjugação e radiomarcagem bem definidas. Por outro lado, peptídeos apresentam a desvantagem da instabilidade metabólica, mas diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas para aumentar sua estabilidade *in vivo*³⁷.

O interesse na utilização de peptídeos radiomarcados iniciou-se com o octreotídeo, um derivado da somatostatina. No final da década de 80, as primeiras imagens planares com o derivado [3-¹²³I-Tyr³]Octreotídeo foram reportadas para uma série de tumores³⁸. Devido à lipofilicidade deste produto, surgiu posteriormente o

Octreotídeo conjugado ao agente quelante DTPA e radiomarcado com ^{111}In , o qual foi o primeiro peptídeo radiomarcado registrado no mundo. O Octreotídeo-DTPA- ^{111}In é utilizado para diagnóstico e estadiamento de tumores neuroendócrinos (NETs) há mais de 20 anos³⁹ e abriu as portas para a conjugação dos derivados da somatostatina ao agente quelante DOTA para radiomarcagem com radioisótopos emissores β^- , tais como ^{177}Lu e ^{90}Y , para terapia radionuclídea dos NETs⁴⁰.

O sucesso dos derivados da somatostatina radiomarcados impulsionou a busca por novos peptídeos cujos receptores são superexpressos em células tumorais. Na TAB. 3 apresentam-se os peptídeos recentemente avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos e os tumores aos quais a expressão dos seus receptores está relacionada. Os derivados da somatostatina continuam sendo extensivamente estudados, com foco na marcação com outros radioisótopos, no acoplamento a novos agentes quelantes e também na modificação da estrutura do peptídeo. Entretanto, outros peptídeos têm surgido como promissores agentes para a marcação para diagnóstico e terapia de outros tipos de tumores. Dentre esses peptídeos, a bombesina é um dos que atrai o maior interesse.

TABELA 3 – Peptídeos regulatórios avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos⁷.

Peptídeo	Receptor	Tumor relacionado
Somatostatina	sst2, sst3, sst5	Tumores neuroendócrinos
Bombesina	BB ₂	Tumores de próstata e mama
Colecistoquinina/gastrina	CCK2	Carcinoma medular da tireóide
Peptídeo RGD	$\alpha_v\beta_3$	Vários
Substância P	NK-1	Glioblastomas
Quimiocinas	CXCR4	Metástases de diversos tumores
Glucagon	GLP-1R	Insulinoma

3.3 BOMBESINA

A bombesina (BBN) é um neuropeptídeo de 14 aminoácidos análogo dos peptídeos humanos liberador de gastrina (GRP) e neuromedina B (NMB), tendo sido isolada da pele do anfíbio *Bombina bombina* e descrita pela primeira vez em 1971⁸. A estrutura da bombesina é mostrada na FIG. 2.

FIGURA 2 – Estrutura da bombesina. A sequência de aminoácidos descrita por Anastasi e colaboradores⁸ foi utilizada para construção da estrutura através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

A bombesina exerce seus efeitos nas células alvo através da ligação a receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana, e ativa a fosfolipase C, aumentando a concentração intracelular de trifosfato de inositol, diacilglicerol e cálcio. Outros mediadores intracelulares ativados pela ligação da BBN aos seus receptores são a proteína quinase ativadora de mitose, a proteína quinase de adesão focal, o fosfatidilinositol 3-quinase e, em alguns casos, o AMP cíclico. A ativação desses receptores desencadeia uma série de funções fisiológicas, além da estimulação da secreção de ácido gástrico. Além de estimular a liberação de vários hormônios, dentre eles a gastrina e a somatostatina, estimula a secreção exócrina pancreática e a contração do músculo liso no estômago e do intestino delgado. A BBN apresenta também efeito proliferativo e protetor contra danos sobre a mucosa do pâncreas e do trato gastrointestinal. Seus efeitos no sistema nervoso central são termorregulação, inibição do hormônio estimulador da função tireoidiana (TSH) e manutenção do ciclo circadiano, além de alterações comportamentais, inibição do apetite e melhoras na memória e no aprendizado em modelos animais¹⁰.

Atualmente existem três tipos de receptores para bombesina descritos em mamíferos, sendo eles: o receptor BB₁, com alta afinidade para NMB; o receptor BB₂, com alta afinidade para GRP; e o receptor órfão BB₃, assim denominado por se desconhecer seu ligante endógeno. O quarto receptor, BB₄, ainda não foi descrito em mamíferos, apenas em anfíbios¹⁰. O interesse em derivados da bombesina radiomarcados para

diagnóstico e/ou terapia de tumores tem crescido consideravelmente a partir da observação de que os receptores BB₂ são superexpressos ectopicamente em células de tumores de próstata⁴¹, mama⁴², cólon e pulmão, além de glioblastomas e neuroblastomas^{6; 11}. Nesses tumores, a ligação aos receptores BB₂ regula a proliferação, a diferenciação e a morfologia celular⁹. Além disso, recentemente, a expressão desses receptores foi associada a vasos sanguíneos de diversos tipos de tumores do trato genitourinário⁴³. Segundo a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA)²⁷, os tipos mais incidentes no Brasil, à exceção do câncer de pele não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino. Portanto, os dois tipos de câncer de maior importância – câncer de próstata e de mama – superexpressam os receptores BB₂ e derivados da bombesina radiomarcados podem ser utilizados para depositar uma dose de radiação nas células desses tumores, permitindo sua detecção e/ou tratamento^{13; 44}.

Um grande número de análogos da bombesina têm sido sintetizados e estudados para diagnóstico por SPECT⁴⁵ ou PET e tratamento de tumores por medicina nuclear⁹. A radiomarcagem requer o acoplamento covalente da sequência de aminoácidos a um agente quelante adequado para ligação ao radionuclídeo, o qual é comumente um metal. Como exemplos de agentes quelantes DTPA, para marcação com ¹¹¹In para aplicação no diagnóstico por SPECT, e o DOTA para marcação com ⁶⁴Cu e ⁶⁸Ga, para aplicação no diagnóstico por PET, bem como com ¹⁷⁷Lu, para aplicação em terapia radionuclídea e no diagnóstico por SPECT⁴⁶.

3.3.1 Derivados da bombesina radiomarcados para diagnóstico de tumores

Modificações moleculares na estrutura da bombesina vêm sendo promovidas a fim de melhorar sua afinidade pelos receptores e especificidade pelas células tumorais. Essas modificações ocorrem principalmente na porção N-terminal do peptídeo, uma vez que a porção C-terminal, que compreende a sequência do aminoácido sete (glutamina, Gln) ao aminoácido 14 (metionina, Met), é responsável pela interação com os receptores e atividade biológica do peptídeo. A porção modificada é denominada espaçador e as moléculas produzidas são os derivados ou análogos da bombesina.

Derivados da bombesina não radiomarcados foram propostos para o tratamento de várias doenças, inclusive do câncer. Nesse caso os análogos utilizados são

antagonistas da bombesina, uma vez que se sabe que os agonistas são estimuladores da proliferação celular, não sendo adequados para tratamento antitumoral⁴⁷. No entanto, a aplicação clínica de antagonistas da bombesina para o tratamento de doenças é questionável. A administração dos derivados em concentrações terapêuticas, as quais são relativamente altas, pode acarretar efeitos adversos ao paciente devido ao bloqueio do receptor GRP em tecidos sadios e, conseqüentemente, bloqueio das respostas fisiológicas desencadeadas pela sua ativação.

Os inconvenientes associados à aplicação de antagonistas da bombesina no tratamento de tumores despertaram o interesse em utilizar esse peptídeo como um carreador de um agente citotóxico às células tumorais. Dentre os agentes disponíveis, os mais estudados são os isótopos radioativos que podem ser aplicados para terapia antitumoral e/ou para diagnóstico por SPECT ou PET. As vantagens da utilização de derivados da bombesina como carreador de um isótopo radioativo são a possibilidade de utilização não só de antagonistas, mas também de agonistas da bombesina, tendo em vista a baixa concentração do derivado administrada ao paciente em relação às concentrações dos antagonistas utilizados em terapia.

Até recentemente, os derivados da bombesina radiomarcados e estudados eram primariamente agonistas dos receptores BB₂, uma vez que estes são internalizados e, por conseguinte, apresentam alta captação tumoral e acúmulo nas células alvo *in vivo*. Entretanto, alguns resultados com antagonistas da somatostatina⁴⁸ demonstraram que, mesmo sendo pouco internalizados, os antagonistas podem ser utilizados para a imagem tumoral, com a vantagem do clareamento mais rápido dos órgãos não-alvo, e resultados semelhantes também foram obtidos com derivados da bombesina⁴⁹. A partir dessa observação, tanto derivados agonistas quanto antagonistas dos receptores BB₂ passaram a ser avaliados nos estudos pré-clínicos. Os agonistas apresentam a sequência da bombesina do aminoácido 7 ao aminoácido 14, enquanto os antagonistas apresentam a sequência do aminoácido 7 ao aminoácido 13. Apesar da variedade de tumores que conhecidamente superexpressam os receptores BB₂, os estudos pré-clínicos com derivados da bombesina, em sua maioria, concentram-se em modelos animais de câncer de próstata e, menos frequentemente, de câncer de mama. Isso provavelmente ocorre pela maior expressão dos receptores nesses dois tipos de tumores, quando comparados aos demais⁴².

A expressão dos receptores BB₂ em células de adenocarcinoma de próstata humano foi estudada por autorradiografia, utilizando-se [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN como radioligante. A próstata normal ou hiperplásica se mostrou negativa para BB₂, enquanto esses receptores são encontrados em alta densidade em carcinomas, em lesões intraepiteliais proliferativas e na fase inicial da transformação neoplásica⁴¹. Em um estudo recente, demonstrou-se por imunohistoquímica a expressão dos receptores BB₂ em câncer de próstata humano, especialmente de baixo grau e de tamanho pequeno⁵⁰. A ativação desses receptores regula a morfologia celular, a diferenciação e a proliferação, assim como a expressão de genes que ativam a angiogênese. Provavelmente esses receptores são marcadores dos eventos moleculares que precedem a carcinogênese e ainda constituem útil ferramenta na diferenciação entre hiperplasia e neoplasia prostática. A presença dos receptores BB₂ é de importante significado biológico e forma a base molecular para o diagnóstico e tratamento dos tumores prostáticos por cintilografia e terapia radioisotópica, respectivamente.

Da mesma forma que para os tumores de próstata, a expressão dos receptores BB₂ foi estudada em câncer de mama por autorradiografia. Os receptores foram detectados em alta densidade em 29 das 46 amostras de carcinoma ductal invasivo e em 11 das 17 amostras de carcinoma *in situ*, e em todas as metástases linfodonais de câncer de mama primário. Também foram encontrados receptores em alta densidade, mas com distribuição heterogênea, em todos os ductos e tecidos viáveis da mama, fato que pode comprometer a detecção de tumores de mama localizados utilizando derivados da bombesina radiomarcados⁵¹.

3.3.1.1 Derivados da bombesina para SPECT

Do ponto de vista da aplicação em SPECT, derivados da bombesina têm sido radiomarcados com ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga e ¹¹¹In, além de radioisótopos com possibilidade de aplicação em terapia, além da aplicação em SPECT, como o ¹⁷⁷Lu.

Derivados da bombesina agonistas e antagonistas dos receptores BB₂, conjugados aos agentes quelantes DOTA e DTPA e de espaçadores diversos foram radiomarcados com ¹¹¹In e avaliados quanto à ligação às células tumorais de próstata *in vitro* e *in vivo*. De uma forma geral, tanto agonistas quanto antagonistas são capazes de se ligar especificamente às células tumorais. Os antagonistas apresentam maior captação

tumoral e clareamento mais rápido dos órgãos não-alvo, mas também do tumor⁵². Os derivados radiomarcados com ¹¹¹In serão abordados detalhadamente mais adiante, nos capítulos 6 e 7.

A bombesina nativa radiomarcada com ^{99m}Tc foi avaliada quanto à capacidade de imagem do câncer de próstata em dez pacientes, dois portadores de adenoma benigno de próstata e oito portadores de câncer de próstata. Os dois pacientes portadores de adenoma benigno de próstata foram negativos para a captação da bombesina radiomarcada com ^{99m}Tc e os oito pacientes portadores de câncer de próstata foram positivos para a captação desse radiofármaco. Além disso, metástases linfodonais foram identificadas em três pacientes, as quais foram confirmadas após a cirurgia. Alta captação também foi observada na bexiga dos pacientes. Os autores concluíram que os resultados obtidos foram encorajadores e que a bombesina radiomarcada poderia ser uma ferramenta útil para diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata⁵³.

Um problema recorrente no desenvolvimento de derivados da bombesina radiomarcados com ^{99m}Tc é a lipofilicidade desses compostos, o que faz com que sua excreção ocorra primariamente por via hepatobiliar, prejudicando a imagem na região abdominal. Esse fato foi observado em derivados da bombesina conjugados ao diaminotiol, ao DTPA e ao P₂S₂⁷. Derivados da bombesina conjugados ao N₃S e com diferentes espaçadores orgânicos de caráter aminoacídico (aminoácido β-Ala) e não aminoacídico (ácido 5-aminovalérico, 5-Ava; ácido 8-aminoctanoico, 8-Aoc; ácido 11-aminoundecanoico, 11-Aun) (FIG. 3) foram radiomarcados com ^{99m}Tc e analisados em camundongos saudáveis e injetados com células tumorais humanas de próstata (PC-3) e mama (MDA-MB-231). Demonstrou-se que, além do agente para ligação ao radioisótopo, o comportamento biológico dos derivados também é diretamente influenciado pelo tipo de tumor, pelo radioisótopo e também pela natureza do grupamento espaçador. Nesse caso, o análogo com grupamento espaçador aminoacídico, representado pelo β-Ala, apresentou vantagens em relação aos demais quanto à captação abdominal, significativamente menor no pâncreas e no intestino⁵⁴. O aumento no tamanho da cadeia carbônica do espaçador favorece o acúmulo abdominal. Portanto, a natureza (orgânica ou inorgânica) e o tamanho da cadeia carbônica dos espaçadores dos derivados da bombesina influenciam diretamente em seu comportamento biológico. Resultados semelhantes foram obtidos para os mesmos derivados radiomarcados com radioisótopos

para diagnóstico⁵⁵ e terapia^{56; 57}.

FIGURA 3 – Derivados da bombesina com diferentes tipos de espaçadores e ligados ao agente quelante N₃S⁵⁴.

Estudos publicados com o mesmo derivado da bombesina – β-Ala-BBN(7-14) – ligado aos quelantes DTMA (ácido 2-N,N'-bis-terc-butoxicarbonil-dietilenotriaminoacético)⁵⁸ e HYNIC (ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico)⁵⁹ e radiomarcado com ^{99m}Tc mostraram que o derivado ligado ao DTMA apresenta menor captação por células de tumor de próstata e eliminação renal e maior captação pancreática e intestinal do que o derivado ligado ao HYNIC. Estes resultados sugerem que há uma relação inversa entre eliminação renal e acúmulo abdominal e ainda indicam que não há relação direta entre captação tumoral e acúmulo nos tecidos que comumente

expressam BB₂.

O derivado da bombesina Pesin, um agonista da BBN que contém a sequência 7-14 e conjugado ao quelante DOTA via espaçador ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanóico (PEG₄), foi radiomarcado com ⁶⁷Ga e ¹⁷⁷Lu e avaliado nas células PC-3 de tumor de próstata humano *in vitro* e *in vivo*. O derivado radiomarcado com ambos os isótopos foi rapidamente internalizado pelas células *in vitro* e apresentou ligação alta e específica e boa retenção tumoral *in vivo*. Contudo, apresentou também alta ligação ao pâncreas dos camundongos *in vivo*. As imagens com o derivado radiomarcado com ⁶⁷Ga e ¹⁷⁷Lu permitiram a visualização do tumor após 1 hora e evidenciaram a retenção no tumor após 3 dias a administração, respectivamente⁶⁰.

Lantry e colaboradores²⁰ descreveram a síntese e a caracterização do derivado agonista da bombesina AMBA radiomarcado com ¹⁷⁷Lu (FIG. 4), um isótopo com aplicações em diagnóstico por SPECT e terapia, especialmente de pequenos tumores e micrometástases. O espaçador desse análogo é misto, constituído de uma cadeia carbônica que reúne aminoácidos e grupamentos orgânicos não peptídicos. Esse derivado apresentou boas propriedades de ligação e internalização pelos receptores BB₂ nos estudos com células PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano *in vitro* e alta captação tumoral nos estudos *in vivo*. No entanto, também apresentou alta captação pelo pâncreas e demais órgãos do sistema gastrointestinal. O AMBA também foi inserido em dois estudos comparativos envolvendo derivados da bombesina com diferentes espaçadores e radiomarcados com ¹¹¹In. Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos para os derivados do estudo marcados com outros radioisótopos, ou seja, importante captação tumoral, mas também alto acúmulo abdominal⁶¹.

FIGURA 4 – Estrutura do AMBA-¹⁷⁷Lu⁶².

Os estudos clínicos realizados com derivados da bombesina para diagnóstico de tumores por SPECT foram realizados com derivados radiomarcados com ^{99m}Tc . O primeiro derivado estudado em humanos com câncer de mama ou próstata foi o RP527⁶³; ⁶⁴. O traçador foi excretado por via renal e gastrointestinal e um bom contraste de imagem foi obtido na região torácica. A imagem de tumores na região abdominal foi problemática devido ao caráter lipofílico do peptídeo e à captação pancreática. O RP527- ^{99m}Tc foi captado especificamente em 4 das 6 lesões malignas de mama, inclusive nas metástases linfodonais e à distância, e em 1 dos 4 carcinomas prostáticos. Os autores concluíram que, do ponto de vista de dosimetria, o uso clínico do RP527- ^{99m}Tc é seguro, considerando-se as doses administradas para aplicação em SPECT, e associado a boa qualidade de imagem. Em um trabalho mais recente⁶⁵, os autores apresentaram imagens obtidas com o RP527- ^{99m}Tc em 9 pacientes com diagnóstico sugestivo de câncer de mama e em 5 pacientes com metástases ósseas de câncer de mama resistentes ao tamoxifeno. O radiofármaco foi captado no tumor primário e metástases linfodonais de 8 das 9 pacientes e não foi captado nas metástases ósseas resistentes ao tamoxifeno. A captação no tumor primário foi relacionada à presença dos receptores BB_2 através de imunohistoquímica.

Um outro estudo clínico foi descrito envolvendo o derivado EDDA/HYNIC-[Lys³]-bombesina radiomarcado com tecnécio-99m em mulheres sadias e portadoras de câncer de mama⁶⁶. Os resultados mostraram que nenhuma das 11 mulheres estudadas apresentou efeitos adversos após a administração do radiofármaco e também acúmulo abdominal reduzido em relação ao RP527- ^{99m}Tc . Porém, não houve diferença significativa entre a captação mamária nas mulheres sadias e portadoras do câncer de mama, indicando que esses derivados não são adequados para imagem tumoral.

3.3.1.2 Derivados da bombesina para PET

A maioria dos estudos publicados com derivados da bombesina radiomarcados com radioisótopos para PET são estudos pré-clínicos. Diversos derivados agonistas ou antagonistas da bombesina já foram desenvolvidos e radiomarcados com diferentes radioisótopos para PET (^{68}Ga , ^{64}Cu e ^{18}F) e utilizando diferentes agentes quelantes, no caso da marcação com radiometais.

A disponibilidade do radioisótopo ^{68}Ga , obtido por meio de gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

incentivou o desenvolvimento de derivados da bombesina marcados com esse radioisótopo. Análogos conjugados ao DOTA foram avaliados em estudos pré-clínicos, permitindo a imagem de tumores 1 hora após a administração, dentre eles o Pesin⁶⁰ e o AMBA⁶⁷. Aspectos específicos dos derivados da bombesina radiomarcados com ⁶⁸Ga serão discutidos no capítulo 8.

O desenvolvimento de derivados da BBN radiomarcados com ⁶⁴Cu se deu a partir do instante que novos agentes quelantes foram desenvolvidos para aumentar a estabilidade dos complexos *in vivo*, comprometida pela transquelação do Cu(II) para as proteínas hepáticas e plasmáticas. Ainda que os quelantes DOTA e TETA (ácido 1,4,8,1-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetracético) e seus análogos diacéticos (DO2A e TE2A) tenham sido utilizados para a marcação de derivados da BBN com ⁶⁴Cu, uma alta radiação de fundo foi observada *in vivo* devido à transquelação^{68; 69}, levando ao desenvolvimento de análogos mais estáveis conjugados aos quelantes NOTA (ácido 1,1,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) e NO2A (ácido 1,1,7-triazaciclononano-1,4-diacético)⁷⁰.

Um estudo comparativo envolvendo um derivado da bombesina conjugado aos quelantes NO2A, TE2A ou DO2A e radiomarcado com ⁶⁴Cu demonstrou que o primeiro quelante é superior aos demais para imagem de tumor de células PC-3 em camundongos⁷¹. O mesmo grupo de pesquisadores comparou agonistas da bombesina ⁶⁴Cu-NO2A-X-BBN(7-14), em que X representava diferentes espaçadores, observando que o espaçador ácido p-aminobenzóico apresentou maior captação pelo tumor de células PC-3 e clareamento mais rápido dos tecidos sadios em relação ao derivado cujo espaçador era o 8-Aoc¹⁷. Mais recentemente, esse grupo de pesquisadores comparou antagonistas da bombesina compostos pelos espaçadores ácido 6-aminohexanóico (6-Ahx), 8-Aoc e ácido 9-aminononanóico (9-Anc). Os três antagonistas apresentaram alta captação tumoral e clareamento mais rápido dos tecidos sadios em relação a agonistas. O clareamento foi mais rápido e o contraste entre tumor e radiação de fundo na imagem MicroPET foi melhor para o antagonista com menor espaçador – 6-Ahx, embora a imagem tenha sido possível com os três antagonistas⁷².

Alguns derivados da bombesina, agonistas e antagonistas, foram radiomarcados com ¹⁸F. Devido à química do ¹⁸F, os grupamentos ligados à sequência da bombesina que permitem a marcação com esse radioisótopo conferem aos compostos uma lipofilicidade maior em relação aos derivados conjugados a quelantes para marcação

com radiometais e radiolantanídeos, favorecendo a captação abdominal dos derivados. De uma forma geral e da mesma maneira que para os derivados radiomarcados com radiometais, os antagonistas apresentaram maior captação tumoral e clareamento mais rápido dos tecidos sadios em relação aos agonistas. Entretanto, tanto agonistas quanto antagonistas apresentaram captação tumoral significativa e a imagem MicroPET do tumor foi possível com todos os derivados, mas também captação abdominal significativa é observada nas imagens, o que pode comprometer a imagem de tumores localizados nessa região^{73; 74}.

Apesar do grande número de estudos pré-clínicos e dos estudos clínicos publicados com derivados da bombesina para SPECT e PET, outras modificações moleculares na bombesina devem ser realizadas, tendo em vista o acúmulo abdominal nos estudos pré-clínicos e a indefinição do real potencial e valor diagnóstico nos estudos clínicos dos derivados descritos até o presente.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo apresentam-se o planejamento dos derivados da bombesina estudados neste trabalho e o delineamento experimental adotado para investigação do seu potencial para aplicação como marcadores moleculares para diagnóstico de tumores por SPECT e PET.

4.1 DERIVADOS DA BOMBESINA

Os derivados da bombesina estudados neste trabalho foram planejados na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) no ano de 2007 com base nos dados de biodistribuição dos derivados publicados até então. Os espaçadores foram escolhidos de modo a aumentar a hidrofiliabilidade da molécula, objetivando diminuir sua captação em órgãos não-alvos a partir do aumento do clareamento sanguíneo, mas mantendo a captação tumoral em um valor aceitável para aplicação no diagnóstico e terapia de tumores. Como resultado dos estudos, obteve-se uma série de derivados da bombesina com espaçadores formados por aminoácidos e a sequência original da bombesina do aminoácido 6 ao aminoácido 14.

A primeira série de derivados obtida foi radiomarcada com $^{177}\text{Lu}^{75}$ para diagnóstico e terapia radionuclídica de tumor de próstata e apresentou resultados promissores nos estudos pré-clínicos^{76; 77}. A série estudada no presente trabalho difere dessa primeira série no primeiro aminoácido do espaçador, modificado de fenilalanina (Phe) para tirosina (Tyr), e no último aminoácido da sequência da bombesina, modificado

para norleucina (Nle) em um dos derivados. A substituição do último aminoácido objetivou prevenir a formação de espécies radioquímicas indesejáveis, originadas da possível oxidação do resíduo de metionina durante o processo de radiomarcagem e armazenamento. Além disso, alguns estudos demonstram que essa substituição aumenta a estabilidade dos derivados em plasma humano e nas células de câncer de próstata e mama. Essas modificações não afetam a afinidade pelos receptores e a internalização⁷⁸.

A sequência da bombesina nativa e dos derivados da bombesina estudados neste trabalho é apresentada na TAB. 4, em que o DTPA e o DOTA representam os grupamentos quelantes para marcação com radiometais e radiolantanídeos e Tyr-(Gly)_n ou PEG₂ são grupamentos espaçadores modificados em relação à estrutura original da BBN.

TABELA 4 – Sequência de aminoácidos da bombesina nativa (14 aminoácidos) e dos seus derivados estudados neste trabalho.

Peptídeo	Quelante	Espaçador	Aminoácidos													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
BBN	-		pGlu	Gln	Arg	Leu	Gly	Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Met
YG ₃	DTPA	-Tyr-Gly ₃ -						Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Met
YG ₅	ou	-Tyr-Gly ₅ -						Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Met
YG ₅ N	DOTA	-Tyr-Gly ₅ -						Asn	Gln	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Nle
BZH3	DOTA	PEG ₂						Tyr	Gln	Trp	Ala	Val	Gly	βAla	Thi	Nle

Os derivados da bombesina foram adquiridos (piChem, Áustria) acoplados aos quelantes DTPA, para marcação com ¹¹¹In, ou DOTA, para marcação com ⁶⁸Ga e ¹¹¹In. O BZH3 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Helmut Mäecke do Hospital Universitário de Basel, Suíça.

4.2 RESUMO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho foi dividida em quatro etapas, descritas nos capítulos 6, 7, 8 e 9. Anteriormente à primeira etapa, fez-se o desenho das estruturas dos derivados da bombesina e o cálculo dos coeficientes de partição teóricos por meio de um programa computacional, os quais estão descritos no capítulo 5.

A primeira etapa teve como objetivo determinar o derivado da bombesina com maior potencial para aplicação *in vivo*. Os parâmetros que interferem nas reações de

marcação dos derivados da bombesina com ^{111}In foram analisados, bem como a estabilidade dos marcadores moleculares frente à reação de marcação, após armazenamento à temperatura ambiente e a 37 °C em soro humano. Por fim, os marcadores moleculares foram avaliados quanto à cinética e biodistribuição em camundongos saudáveis e biodistribuição em modelo animal de tumor de próstata. O esquema de realização dos experimentos nessa primeira etapa é apresentado na FIG. 5.

FIGURA 5 – Esquema do delineamento experimental da primeira etapa do trabalho.

Na segunda etapa do trabalho, o derivado escolhido da primeira etapa e conjugado aos quelantes DTPA e DOTA foi analisado comparativamente quanto à capacidade de se ligar a células tumorais que expressam os receptores BB_2 *in vitro* e *in vivo*, de modo a investigar a influência do agente quelante sobre as propriedades do marcador molecular *in vitro* e *in vivo*. O derivado da BBN conjugado ao DTPA e DOTA foi

radiomarcado com ^{111}In e avaliado quanto à estabilidade em plasma de camundongo e ligação, internalização e efluxo em células tumorais *in vitro*. Já os estudos *in vivo* envolveram ensaios de saturação e competição, bem como estudos de imagem SPECT/CT, biodistribuição e estabilidade. A fim de avaliar o potencial do marcador molecular para aplicação *in vivo*, alguns dos estudos foram realizados comparativamente com um derivado amplamente descrito pela literatura, denominado BZH3¹⁴ (FIG. 6), cujo espaçador é o etilenoglicol (PEG₂).

FIGURA 6 – Estrutura do derivado da bombesina BZH3¹⁴.

O esquema da realização dos experimentos realizados na segunda etapa do trabalho é apresentado na FIG. 7.

FIGURA 7 – Esquema do delineamento experimental da segunda etapa do trabalho.

A terceira etapa do trabalho (FIG. 8) consistiu na radiomarcção com ^{68}Ga do derivado da bombesina conjugado ao agente quelante DOTA, na bancada e utilizando um módulo de síntese automatizado. O marcador molecular para PET produzido foi então avaliado quanto à estabilidade à temperatura ambiente e biodistribuição em camundongos saudáveis e em modelo animal de tumor de próstata.

FIGURA 8 – Esquema do delineamento experimental da terceira etapa do trabalho.

Por fim, o derivado da bombesina correspondente ao marcador molecular que apresentou maior potencial para aplicação clínica foi submetido a estudos toxicológicos em ratos, a fim de avaliar se a administração do derivado da bombesina pode causar dano aos diferentes tecidos do organismo.

ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Um importante passo na ligação de uma molécula ao seu alvo é sua interação biológica com o receptor. No caso específico dos derivados da bombesina, sua interação com receptores BB_2 , presentes nas células tumorais. Entretanto, o estudo direto da interação ligante-receptor por mecânica e dinâmica molecular não é possível na maioria dos casos, uma vez que a estrutura do receptor ou sítio de ligação não é conhecida. Nesse caso, propriedades físico-químicas podem ser utilizadas como guia para correlacionar as propriedades biológicas observadas e a estrutura química da molécula⁷⁹.

A lipofilicidade é uma propriedade físico-química que atrai interesse considerável em química medicinal. As interações hidrofóbicas com o receptor, os mecanismos de transferência através das membranas biológicas, bem como a toxicidade da molécula são aspectos relacionados à sua lipofilicidade. O coeficiente de partição octanol-água, utilizado em sua forma logarítmica ($\log P$), é a medida de lipofilicidade mais aceita e se refere à partição da mesma espécie de uma molécula entre o octanol e a fase aquosa⁸⁰.

A fim de relacionar as propriedades biológicas dos derivados da bombesina com as suas respectivas estruturas, neste capítulo apresentam-se as estruturas e o cálculo do coeficiente de partição teórico dos derivados da bombesina estudados neste trabalho.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- ✓ desenhar as estruturas dos derivados da bombesina estudados neste trabalho;
- ✓ calcular o coeficiente de partição ($\log P$) dos derivados da bombesina e do BZH3, de modo a relacioná-los ao espaçador e, posteriormente, às suas propriedades e atividade biológica;
- ✓ obter os mapas lipofílicos dos derivados da bombesina;
- ✓ calcular o coeficiente de partição dos derivados da bombesina conforme o pH em que se encontram, de modo a relacionar posteriormente o pH e a lipofilicidade às suas propriedades e atividade biológica.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

Os estudos computacionais foram realizados no pacote de programa MarvinSketch 5.0 (ChemAxon, EUA) e contaram com a colaboração da Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pesquisadora convidada do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Construção das estruturas

As estruturas dos agentes quelantes em duas dimensões (2D) foram construídas a partir de modificações de compostos cíclicos e acíclicos constantes na biblioteca do programa.

As estruturas dos peptídeos em 2D foram construídas pela adição de aminoácidos à cadeia polipeptídica e posterior ligação da cadeia ao sítio de ligação ao agente quelante pré-construído. Ao final, foram minimizadas utilizando a opção de minimização de energia disponível no pacote do programa.

5.2.2.2 Cálculo do coeficiente de partição (log P) e construção do mapa lipofílico

O coeficiente de partição (log P) dos derivados da bombesina foi calculado pelo método Weighted⁷⁹, com pesos iguais dos métodos VG, KLOP e PHYS e concentração de Cl⁻, Na⁺ e K⁺ de 0,1 M. Esse método calcula o coeficiente de partição da molécula por meio da somatória do coeficiente de partição dos grupos que a formam e constrói o mapa lipofílico a partir do cálculo realizado.

5.2.2.3 Cálculo do coeficiente de distribuição (log D)

Moléculas que possuem a capacidade de se ionizar podem existir em uma solução como um equilíbrio entre as formas dissociadas e não dissociadas nos diferentes pHs. Nesse caso, o coeficiente de distribuição, que consiste no coeficiente de partição considerando a contribuição das formas dissociadas e não dissociadas em cada pH, pode ser calculado. O coeficiente de distribuição (log D) foi calculado pelo método Weighted, conforme descrito anteriormente⁷⁹.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 Construção das estruturas

As estruturas dos agentes quelantes DTPA e DOTA são apresentadas nas FIG. 9 e 10, respectivamente.

FIGURA 9 – Estrutura do agente quelante DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 10 – Estrutura do agente quelante DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

As FIG. 11 a 17 ilustram a estrutura dos derivados da bombesina YG₃, YG₅ e YG₅N acoplados aos agentes quelantes DTPA e DOTA.

FIGURA 11 – Estrutura do YG₃-DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 12 – Estrutura do YG₃-DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 13 – Estrutura do YG₅-DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 14 – Estrutura do YG₅-DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 15 – Estrutura do YG₅N-DTPA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 16 – Estrutura do YG₅N-DOTA. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

FIGURA 17 – Estrutura do BZH3. A estrutura foi construída através do programa MarvinSketch (ChemAxon).

5.3.2 Cálculo do coeficiente de partição (log P) e construção do mapa lipofílico

Na TAB. 5 apresentam-se os coeficientes de partição teóricos (log P) e os coeficientes de distribuição (log D) dos derivados da bombesina calculados através do programa MarvinSketch. De forma geral, todos os derivados da bombesina são compostos hidrofílicos. O derivado da bombesina BZH3 é mais lipofílico do que os derivados da bombesina YG₃, YG₅ e YG₅N conjugados aos quelantes DTPA e DOTA, indicando que o espaçador aminoacídico confere maior hidrofiliabilidade aos compostos em relação ao espaçador orgânico não aminoacídico que, no caso do BZH3, é representado pelo etilenoglicol.

A variação observada para os coeficientes de distribuição (log D) no ponto isoelétrico seguiu o mesmo padrão do coeficiente de partição. O ponto isoelétrico consiste no pH no qual as cargas positivas e negativas existem na mesma proporção na solução. Nesse caso, a lipofilicidade é ainda menor do que das moléculas não ionizadas.

TABELA 5 – Coeficientes de partição (log P) e coeficiente de distribuição (log D) no ponto isoelétrico dos derivados da bombesina calculados através do programa MarvinSketch.

Derivado da BBN	Agente quelante	log P de moléculas não ionizadas	log D no ponto isoelétrico
YG₃	DTPA	-8,51	-13,13
	DOTA	-8,56	-16,00
YG₅	DTPA	-10,73	-15,51
	DOTA	-10,77	-18,22
YG₅N	DTPA	-9,97	-14,75
	DOTA	-10,01	-17,45
BZH3	DOTA	-3,12	-10,18

Os mapas lipofílicos dos derivados da bombesina são mostrados nas FIG. 18 a 24. A forma de projeção utilizada foi transparente e a escala de cores o arco-íris invertido, nas quais os grupos da molécula estão posicionados no mapa e as regiões mais lipofílicas são mostradas em laranja e as menos lipofílicas em azul, passando pelo amarelo e verde. Pode-se observar que o grupo que confere maior hidrofiliicidade aos derivados da bombesina é o quelante bifuncional e que a substituição da metionina terminal pela norleucina diminui a hidrofiliicidade da porção C-terminal dos peptídeos.

FIGURA 18 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG₃-DTPA.

FIGURA 19 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG₃-DOTA.

FIGURA 20 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG₅-DTPA.

FIGURA 21 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG₅-DOTA.

FIGURA 22 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG₅N-DTPA.

FIGURA 23 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do YG₅N-DOTA.

FIGURA 24 – Contribuição de cada grupo da molécula para o log P e mapa lipofílico do BZH3.

5.3.3 Cálculo do coeficiente de distribuição (log D)

Na TAB. 6 apresentam-se os coeficientes de distribuição dos derivados da bombesina conforme o pH do meio em que se encontram. Pode-se observar que, para todos os derivados, o maior coeficiente de distribuição ocorre em pH 3,0, decrescendo à medida que a solução fica mais básica.

TABELA 6 – Coeficiente de distribuição (log D) dos derivados da bombesina de acordo com o pH do meio em que se encontram.

pH	YG ₃		YG ₅		YG ₅ N		BZH3
	DTPA	DOTA	DTPA	DOTA	DTPA	DOTA	DOTA
0,00	-14,89	-17,46	-17,10	-19,67	-16,34	-18,91	-11,08
1,00	-13,66	-16,20	-15,87	-18,41	-15,11	-17,65	-10,30
2,00	-12,74	-15,31	-14,95	-17,52	-14,19	-16,76	-9,51
3,00	-12,54	-15,14	-14,75	-17,35	-13,99	-16,59	-9,34
4,00	-13,30	-15,36	-15,51	-17,57	-14,75	-16,81	-9,56
5,00	-15,40	-16,00	-17,61	-18,22	-16,85	-17,45	-10,18
6,00	-17,81	-16,54	-20,02	-18,75	-19,26	-17,99	-10,71
7,00	-20,05	-17,03	-22,26	-19,24	-21,50	-18,48	-11,48
8,00	-21,48	-17,53	-23,69	-19,74	-22,93	-18,98	-12,52
9,00	-21,99	-18,13	-24,20	-20,34	-23,44	-19,58	-13,21
10,00	-22,85	-19,35	-25,06	-21,56	-24,30	-20,80	-14,15
11,00	-23,98	-20,51	-26,19	-22,73	-25,43	-21,97	-15,12
12,00	-24,62	-21,16	-26,83	-23,37	-26,07	-22,61	-15,72
13,00	-24,77	-21,31	-26,98	-23,52	-26,22	-22,76	-15,88
14,00	-24,79	-21,33	-27,00	-23,54	-26,24	-22,78	-15,89

5.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados e discussões anteriores, pode-se concluir que:

- ✓ Os coeficientes de partição dos derivados da bombesina YG₃, YG₅ e YG₅N sugerem que esses derivados são pouco lipofílicos;
- ✓ a substituição do quelante DTPA pelo DOTA diminui discretamente a lipofilicidade dos compostos;
- ✓ o aumento do espaçador de três para cinco aminoácidos glicina diminui significativamente a lipofilicidade dos derivados;
- ✓ a substituição da metionina terminal pela norleucina aumenta discretamente a lipofilicidade do derivado da bombesina;
- ✓ o derivado da bombesina BZH3 é mais lipossolúvel do que os derivados da bombesina YG₃-DOTA, YG₅-DOTA e YG₅N-DOTA.

6

MARCADORES MOLECULARES PARA SPECT: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE ESPAÇADORES

Neste capítulo apresentam-se a revisão bibliográfica, os métodos, resultados e discussões e conclusões relativos à primeira etapa do trabalho, que consistiu na radiomarkação dos derivados da bombesina conjugados ao quelante bifuncional DTPA com índio-111 e avaliação comparativa dos marcadores moleculares produzidos, com ênfase no efeito do espaçador sobre suas estabilidades *in vitro* e comportamento biológico *in vivo*.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- ✓ Desenvolver um método de marcação com ^{111}In aplicável aos derivados ligados ao quelante DTPA através do estudo exaustivo dos seus parâmetros;
- ✓ radiomarcas os derivados da bombesina de diferentes espaçadores e ligados ao quelante DTPA com índio-111, de modo a obter marcadores moleculares com alta pureza radioquímica e alta atividade específica;
- ✓ determinar experimental e comparativamente a lipofilicidade dos derivados radiomarcados;

- ✓ caracterizar e comparar o perfil farmacocinético e de biodistribuição dos marcadores moleculares de ^{111}In em camundongos saudáveis;
- ✓ comparar a ligação dos marcadores moleculares de ^{111}In às células de adenocarcinoma de próstata humano em modelo animal e
- ✓ determinar o marcador molecular com maior potencial para aplicação no diagnóstico de tumores.

6.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA

O índio-111 (^{111}In) é um radioisótopo produzido em ciclotron pela irradiação do cádmio-112 (^{112}Cd) com prótons. Decai primariamente por captura eletrônica, com meia-vida física de 67,9 horas. Os principais fótons emitidos apresentam 171 e 245 keV de energia. No momento da calibração, os contaminantes radioativos $^{114\text{m}}\text{In}$ ($t_{1/2} = 49,5$ dias) e ^{65}Zn ($t_{1/2} = 244$ dias) devem representar menos de 0,06 % da atividade total da amostra. O ^{111}In é fornecido na forma de cloreto de índio-111, diluído em ácido clorídrico (pH 1,0 – 1,4) e precauções devem ser tomadas quanto ao pH da solução, cujo aumento pode resultar em formação de colóides. Uma vez que a preparação da maioria dos radiofármacos requer pHs mais altos que 1,4 (pH 4,0 a 5,5), o processo de radiomarcagem com ^{111}In inclui o tamponamento da solução com um agente quelante fraco, tais como citrato, acetato e tartarato de sódio⁸¹. O acoplamento do ^{111}In à molécula é realizado via quelante bifuncional⁸².

Derivados da bombesina de espaçadores de natureza diversa – não-aminoacídico, aminoacídico e misto – já foram radiomarcados com índio-111 e os resultados obtidos foram promissores. Hoffman e colaboradores estudaram uma série de derivados da bombesina conjugados ao DOTA – DOTA-X-BBN[7-14] NH_2 , em que X é um espaçador orgânico de caráter aminoacídico (β -Ala) ou não aminoacídico (5-Ava, 8-Aoc e 11-Aun). Apesar da alta pureza radioquímica obtida nas reações de marcação (90 – 95 %), a atividade específica dos derivados radiomarcados foi baixa (481 MBq/ μmol). Mesmo com baixa atividade específica, os derivados obtidos foram submetidos a ensaios *in vivo* e *in vitro* e apresentaram capacidade de reconhecimento dos receptores BB_2 , localizados no pâncreas dos camundongos saudáveis. A ligação pancreática e a excreção intestinal foram maiores para os derivados com maior espaçador, demonstrando que o aumento na cadeia carbônica aumenta a ligação aos receptores, mas também a lipofilicidade dos

derivados da bombesina. O derivado que apresentou maior captação pancreática - DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH₂ – foi avaliado em estudos de biodistribuição em camundongos implantados com adenocarcinoma de próstata humano e apresentou alta captação tumoral (aproximadamente 4 % do total de atividade administrada por grama de tumor - % AI/g, 1 hora após a administração intravenosa), mas também elevada captação pancreática (aproximadamente 18 % AI/g) no mesmo tempo. A captação tumoral e pancreática foram reduzidas pela pré-administração do mesmo derivado não radiomarcado, dado indicativo de ligação receptor-específica⁵⁵.

Visser e colaboradores compararam derivados da bombesina (FIG. 25) conjugados ao quelante DTPA quanto à ligação às células tumorais CA20948 e PC-3 *in vitro* e *in vivo*⁸³. A captação pancreática dos derivados em ratos foi baixa (1 % AI/g), ao contrário da observada em camundongos (8-15 % AI/g). A ligação tumoral observada foi semelhante para as duas linhagens celulares estudadas, mas menor do que os demais derivados até então descritos. Esses resultados sugerem que a observância de captação pancreática alta nem sempre está relacionada à maior captação tumoral. Resultados semelhantes foram encontrados para o análogo da bombesina aminohexanoil-[D-Phe⁶-NHCH₂CH₂CH₃¹³,des Met¹⁴]BBN(6-14) radiomarcado com ¹¹¹In⁸⁴.

FIGURA 25 – Derivados da bombesina radiomarcados com índio-111 e estudados por Visser e colaboradores⁸³. Dados: Acp = 1-aminoetil,4-carboximetil-piperazina; Tha = β-(2-Tienil)-alanina; ACMPip = 4-amino-carboximetilpiperidina; Dpr = ácido 1,2-diaminopropiônico; βAla = β-alanina.

Diversos análogos da bombesina de diferentes espaçadores – X-BBN(7-14)NH₂-DOTA – foram envolvidos em um estudo comparativo de seu comportamento *in vitro* e *in vivo* após a radiomarcagem com ¹¹¹In (FIG. 26). A pureza radioquímica das marcações foi baixa, sendo necessário procedimento de purificação por CLAE, após o qual a pureza radioquímica do derivado foi 93 %. Os derivados estudados apresentaram internalização semelhante pelas células PC-3, mas externalização variável. Apesar das diferenças observadas, todos apresentaram alta captação pancreática em camundongos saudáveis (maior que 14 % AI/g para todos os derivados) e implantados com células PC-3 e a captação tumoral não foi diretamente proporcional à captação pancreática. Esses resultados demonstram, mais uma vez, a impossibilidade de se estabelecer uma relação direta entre captação tumoral e pancreática¹⁸.

FIGURA 26 – Derivados da bombesina radiomarcados com índio-111 por Garrison e colaboradores¹⁸.

O derivado de espaçador 8-Aoc, incluído no estudo descrito anteriormente, e radiomarcado com ^{111}In foi recentemente avaliado quanto à capacidade de detecção de metástases ósseas em um modelo animal de câncer de próstata metastático, tendo sido capaz de identificar metástases de 0,3 mm por MicroSPECT/CT apenas 21 dias após a inoculação das células tumorais⁸⁵.

Ho e colaboradores radiomarcaram o derivado da bombesina $[\text{Lys}^3\text{-Tyr}^4]\text{-BN-DTPA}$ em ácido acético 0,1 M e à temperatura ambiente e analisaram suas propriedades *in vitro* e *in vivo*. O derivado $[\text{Lys}^3\text{-Tyr}^4]\text{-BN-DTPA-}^{111}\text{In}$ foi obtido com alta pureza radioquímica (> 95 %) e alta atividade específica (200 GBq/ μmol) e apresentou alta estabilidade em solução salina à temperatura ambiente, mas não em plasma humano e de rato *in vitro*. Além disso, apresentou significativa ligação às células PC-3 em estudo de ligação *in vitro* e de biodistribuição *in vivo*. A maior ligação tumoral *in vivo* foi observada 8 horas após a administração (2,5 % AI/g) e a ligação pancreática no mesmo tempo foi alta, cerca de 32 % do total da atividade administrada. Essa alta captação dificultou a visualização do tumor nos estudos de imagem⁴⁵.

Mansi e colaboradores⁸⁶ compararam as propriedades *in vivo* e *in vitro* de um antagonista dos receptores BB_2 – RM1 – radiomarcado com ^{111}In ao potente agonista AMBA (FIG. 27), previamente radiomarcado com ^{177}Lu e avaliado em um estudo em modelo animal de tumor de próstata²⁰. Ambos os derivados apresentaram ligação específica e tempo-dependente às células PC-3 *in vitro* e foram internalizados, mas a internalização foi significativamente maior para o agonista $\text{AMBA-}^{111}\text{In}$. Esse dado contradiz dados da literatura que sugerem que agonistas da BBN se ligam aos receptores

BB₂ nas células alvo e são internalizados, enquanto os antagonistas não o são⁴⁹. Os estudos *in vivo* em animais com tumor de células PC-3 mostraram que ambos os derivados apresentam alta captação pancreática e significativa captação tumoral. A captação pancreática foi maior para o agonista AMBA-¹¹¹In (aproximadamente 60 % AI/g, contra 22 % AI/g do RM1-¹¹¹In), e a captação tumoral foi maior para o antagonista RM1-¹¹¹In (aproximadamente 14 % AI/g, contra 4 % AI/g do AMBA-¹¹¹In). Ambas as captações foram reduzidas pela pré-administração de excesso dos peptídeos frios, demonstrando especificidade da ligação aos receptores. Além disso, a captação tumoral permitiu a visualização do tumor, apesar da alta concentração de radioatividade na região abdominal.

FIGURA 27 – Antagonista (RM1) e agonista (AMBA) da bombesina estudados por Mansi e colaboradores⁸⁶.

O AMBA e outros derivados da bombesina (TAB. 7) foram também radiomarcados com ¹¹¹In para avaliação comparativa quanto à ligação a células de tumor de próstata *in vivo*. Os derivados ligados ao DTPA foram radiomarcados de acordo com o protocolo de Breeman e colaboradores⁸², os derivados ligados ao DOTA foram

radiomarcados a 80 °C por 20 minutos e o derivado Demobesin-1 foi radiomarcado com ^{99m}Tc . A fim de prevenir a oxidação e a radiólise dos derivados durante e após as reações, adicionou-se metionina, ácido gentísico e ácido ascórbico às marcações. Os derivados ligados ao DTPA e DOTA foram obtidos com alta pureza radioquímica (> 97 %) e atividade específica (270 GBq/ μmol e 30 GBq/ μmol , respectivamente). Em um estudo de estabilidade *in vivo*, todos os derivados apresentaram baixa estabilidade, sendo o Demobesin-1 o mais estável. Nos estudos de biodistribuição, a captação tumoral e pancreática foi variável, e os derivados que apresentaram maior captação pancreática – AMBA e Demobesin-1 – foram também os que apresentaram maior captação tumoral⁶¹. Recentemente, o AMBA foi avaliado em estudos dosimétricos em animais, os quais mostraram que, apesar de a dose absorvida no tumor de células PC-3 ser significativamente maior do que nos demais órgãos, a dose absorvida no intestino grosso, rins e pâncreas é considerável e pode comprometer sua aplicação clínica⁸⁷. A maior dose no intestino grosso e pâncreas decorre da presença dos receptores BB₂ no cólon e pâncreas dos camundongos⁸⁸.

TABELA 7 – Sequência de aminoácidos dos análogos da bombesina estudados por Shroeder e colaboradores⁶¹.

Análogo	Quelante	Espaçador	Sequência da bombesina
MP2653	DTPA		[aCMPip ⁵ ,Tha ^{6,13} ,Nle ¹⁴]BBN(6-14)
MP2346	DOTA		[Pro ¹ ,Tyr ⁴]BBN
Pesin	DOTA	dPEG ₄	BBN(6-14)
AMBA	DOTA	CH ₂ CO-Gly-4-aminobenzil	BBN(6-14)
Demobesin-1	N ₄	BzDig	[DPhe ¹ ,Leu-NHET ¹³]BBN(6-13)

Legenda: N₄ = 6-R-1,4,8,11-tetrazaundecano; PEG = polietilenoglicol; BzDig = ácido p-aminobenzildiglicólico; Gly = glicina; aCMPip = 4-amino-carboximetilpiperidina; Tha = β -(2-tienil)-alanina; Nle = norleucina; Pro = prolina; Tyr = tirosina; BBN(6-14) = sequência da bombesina do aminoácido 6 ao 14; Phe = fenilalanina; Leu = leucina. Tha e Nle são aminoácidos sintéticos.

Mansi e colaboradores radiomarcaram o antagonista da BBN RM2 (FIG. 28) com ^{111}In e avaliaram a afinidade pelas células PC-3 *in vivo* e *in vitro*. Esse antagonista apresentou ligação específica e de alta afinidade e baixa internalização pelas células PC-3

in vitro e alta captação tumoral e pelos tecidos saudáveis nos estudos *in vivo*. Entretanto, confirmando a característica dos antagonistas, o clareamento dos tecidos saudáveis é mais rápido do que do tumor⁸⁹.

FIGURA 28 – Estrutura do antagonista da bombesina RM2⁸⁹.

Devido à grande variedade de protocolos de marcação com índio-111, é necessário estudar exaustivamente os parâmetros da reação para uma série específica de peptídeos, a fim de obter alta pureza radioquímica associada à atividade específica satisfatória, sem perda da integridade proteica. Os parâmetros de marcação dependem primariamente do agente quelante ligado, da presença de carreador na amostra de radionuclídeo e do peptídeo que se deseja radiomarcá-lo; e influenciam diretamente na qualidade do marcador molecular obtido. Além disso, apesar do grande número de derivados agonistas e antagonistas da bombesina com espaçadores de diversas naturezas e radiomarcados com índio-111 desenvolvidos, um radioligante com características ótimas para aplicação *in vivo*, ou seja, que apresenta alta atividade específica, estabilidade que permita sua aplicação clínica, máxima de captação tumoral com o mínimo de acúmulo nos tecidos saudáveis, especialmente no pâncreas, ainda não foi descrito e seu desenvolvimento é uma contribuição de suma importância para diagnóstico e tratamento de tumores que superexpressam receptores BB₂. Essas características adequadas são diretamente influenciadas pelo espaçador do derivado, o qual determina o perfil de biodistribuição e a capacidade de reconhecimento dos receptores nas células-alvo. Nesse interim, o método de marcação dos derivados da bombesina envolvidos neste trabalho e as propriedades *in vitro* e *in vivo* dos marcadores moleculares produzidos devem ser conhecidas e comparadas, a fim de se determinar o marcador molecular com maior potencial para aplicação *in vivo* e com o qual os demais estudos serão realizados.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 Infraestrutura

Os ensaios compreendidos nesta etapa do trabalho foram realizados nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento de Radiofármacos da Instalação de Radiofarmácia da DIRF, no laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia (CB) e no Biotério, todos sediados no IPEN. Esses laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais, respectivamente.

6.3.2 Materiais

6.3.2.1 Reagentes

Os principais reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ acetato de sódio anidro (Nuclear, Brasil);
- ✓ acetona (Merck, Alemanha);
- ✓ acetonitrila para CLAE (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Alemanha);
- ✓ álcool etílico (Merck, Alemanha);
- ✓ acetona ultrapura (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido clorídrico ultrapuro (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido cítrico (Cromato Produtos Químicos, Brasil);
- ✓ ácido trifluoroacético para CLAE (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ DL-metionina (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ ácido gentísico (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ ácido ascórbico (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX 45 Millipore, EUA);
- ✓ citrato de sódio diidratado (J. T. Baker, EUA);
- ✓ cloreto de índio-111 (Nordion, Canadá);
- ✓ meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab);
- ✓ soro fetal bovino (Cultilab);

- ✓ penicilina:estreptomicina (Cultilab);
- ✓ matrigel (BD-Biosciences);
- ✓ resina Chellex 100 (BioRad, EUA);
- ✓ peptídeos derivados da bombesina (piCHEM, Áustria).

6.3.2.2 Equipamentos, materiais e sistemas

Os principais equipamentos, materiais e sistemas utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- ✓ calibrador de atividade (CRMTM-35R – Capintec, EUA);
- ✓ coluna de fase reversa C₁₈ para cromatografia líquida de alta eficiência (Delta-Pak, 3,9 x 150 mm, 5 µm – Waters, EUA);
- ✓ contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) D5002 cobra II (Packard-Canberra, EUA);
- ✓ cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por sistema modulado constituído por bomba LC-10 ATvp, controlador automático de gradiente FCV-10 AL, degaseificador DGU-20A5, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector UV SPD-10A e forno CTO-10 Avp (Shimadzu, Japão);
- ✓ detector radioativo Shell Jr. 1000/2000 (câmara de cintilação – NaI) do sistema CLAE (Shell-usa, EUA);
- ✓ frascos para cultivo de células (Costar, EUA);
- ✓ medidor de pH (Tecnopon, Brasil);
- ✓ material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e criotubos;
- ✓ pipetas automáticas (Brand e Socorex);
- ✓ suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada TLC-SG (Merck, Alemanha);
- ✓ ultracentrífuga MIKRO 220R (Hettich, Alemanha);
- ✓ vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas.

6.3.2.3 Tampões e soluções

Os principais tampões e soluções utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % (v/v) em acetonitrila (CH_3CN);
- ✓ ácido trifluoroacético 0,1 % (v/v) em água (H_2O);
- ✓ solução de EDTA 0,2 M pH 5,0 em água;
- ✓ solução fosfato-salina (PBS) pH 7,4;
- ✓ solução de NaCl 0,9 % (p/v) em água;
- ✓ tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5;
- ✓ tampão citrato 0,1 M pH 5,0.

6.3.2.4 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos *BALB/c*, de seis a dez semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso, e *Nude*, de seis a dez semanas de idade e 15 a 20 gramas de peso, machos (Biotério – IPEN). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

6.3.3 Métodos

6.3.3.1 Metodologias analíticas

A) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi utilizada para determinação da pureza radioquímica dos marcadores moleculares. A pureza radioquímica é definida como a porcentagem do total da radioatividade que se encontra na forma química desejada, ou seja, de marcadores moleculares de ^{111}In .

Estudos preliminares foram realizados para determinar o sistema cromatográfico mais adequado para separação do ^{111}In não ligado dos marcadores moleculares. Aplicou-se uma alíquota da mistura de radiomarcagem sobre as fitas de sílica gel 60 (1,2 x 10 cm) e procedeu-se à cromatografia utilizando como fase móvel solução de EDTA 0,2 M pH 5,0. Nesse sistema, o marcador molecular permanece na origem da fita (R_f 0,0 – 0,1), enquanto o $^{111}\text{InCl}_3$ migra com R_f 0,6 – 0,8.

B) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada para determinação da pureza radioquímica e análise da estabilidade dos marcadores moleculares. Dois métodos foram utilizados, conforme descrito anteriormente⁵⁶, salvo algumas modificações. Procedeu-se à cromatografia em fase reversa em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C₁₈ (Waters, 150 mm x 4,0 mm, 5 µm) e detector de radiação gama (Shell Jr). No primeiro método (método A), o fluxo utilizado foi de 1,5 mL/minuto com gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH₃CN (1 % v/v) em TFA:H₂O (1 % v/v) por 15 minutos, retornando ao estado inicial por cinco minutos para estabilização do sistema. No segundo método (método B), o fluxo utilizado foi de 1,0 mL/minuto com gradiente linear de 10 a 40 % (v/v) de TFA:CH₃CN (1:1000 v/v) em TFA:H₂O (1:1000 v/v) por 20 minutos, retornando ao estado inicial por cinco minutos para estabilização do sistema. Analisou-se também, para fins comparativos, o perfil do ¹¹¹InCl₃ nos dois métodos e dos peptídeos não radiomarcados utilizando detector UV 190 – 300 nm (Shimadzu) e comprimento de onda 280 nm.

6.3.3.2 Desenvolvimento do método de radiomarcação dos derivados da bombesina com índio-111

Estudos de radiomarcação foram realizados com o derivado YG₅-DTPA, a fim de estabelecer a melhor condição de marcação dos derivados da bombesina. Todos os reagentes utilizados nas reações foram preparados com água purificada por equipamento de osmose reversa e tratada com resina Chelex 100 para remoção de íons metálicos. As replicatas dos experimentos foram realizadas em dias diferentes.

A) Determinação da temperatura de marcação

Adicionou-se 18-22 MBq (500-600 µCi) de ¹¹¹InCl₃ (livre de carreador), diluído em HCl 0,05 M, a 10 µg do derivado YG₅-DTPA e ajustou-se o volume para 200 µL com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. As misturas de reação foram incubadas por 30 minutos, a diferentes temperaturas (25, 40 e 55 °C) e agitação de 350 rpm. Ao final, a pureza radioquímica foi determinada por CCD, conforme descrito na seção 6.3.3.1 (A). O experimento foi realizado em duplicata.

B) Determinação da massa de peptídeo na marcação

Adicionou-se 18,5 MBq (500 μ Ci) de $^{111}\text{InCl}_3$ (livre de carreador), diluído em HCl 0,05 M, a diferentes massas (0,625 – 10 μ g) de YG₅-DTPA e ajustou-se o volume para 200 μ L com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. Incubou-se por 30 minutos, a 25 °C e agitação de 350 rpm e a pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). O experimento foi realizado em triplicata.

C) Determinação do tempo de marcação

Adicionou-se 18,5 MBq de $^{111}\text{InCl}_3$ (0,5 mCi; livre de carreador), diluído em HCl 0,05 M, a 10 μ g de YG₅-DTPA e ajustou-se o volume para 200 μ L com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. Incubou-se a mistura por diferentes tempos (5 a 30 minutos) a 25 °C e agitação de 350 rpm e a pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD), conforme descrito na seção 6.3.3.1 (A). O experimento foi realizado em duplicata.

D) Determinação da atividade de $^{111}\text{InCl}_3$ na marcação

Adicionou-se diferentes atividades de $^{111}\text{InCl}_3$ (18,5 – 832,5 MBq; 500 μ Ci – 22,5 mCi; livre de carreador), diluído em HCl 0,05 M, a 2,5 ou 10 μ g de YG₅-DTPA e ajustou-se o volume para 200 μ L com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. Incubou-se por 15 minutos, a 25 °C e agitação de 350 rpm e a pureza radioquímica foi determinada por CCD, conforme descrito na seção 6.3.3.1 (A), e confirmada por CLAE (método A), conforme descrito na seção 6.3.3.1 (B).

E) Avaliação da oxidação da metionina

As condições de temperatura, massa de peptídeo e atividade de $^{111}\text{InCl}_3$ na marcação, bem como o tempo de reação, otimizadas nos experimentos descritos anteriormente, foram submetidas à avaliação quanto à capacidade de provocar oxidação da metionina, último aminoácido na cadeia peptídica do derivado YG₅-DTPA. Para tal, as marcações foram realizadas contendo ou não metionina (100 μ g ou 1 mg) no meio. A pureza radioquímica foi determinada por CCD e a oxidação da metionina foi avaliada por CLAE (método A), conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados

em triplicata.

6.3.3.3 Radiomarcção dos derivados da bombesina com ^{111}In

Os derivados da bombesina YG₃-DTPA, YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA foram radiomarcados com ^{111}In conforme os parâmetros otimizados. A condição padrão de marcação e suas razões 1/5 ou 1/10 foram utilizadas para obter marcadores moleculares para os demais experimentos. Resumidamente, 10 µg dos peptídeos reagiram com 925 MBq de $^{111}\text{InCl}_3$ por 15 minutos, a 25 °C e 0,5 mg/mL de metionina. O pH foi mantido em 4,5 com tampão acetato 0,4 M e o volume de reação em 200 µL. Ao final das reações, determinou-se a pureza radioquímica por CCD e CLAE (método A), conforme descrito anteriormente na seção 6.3.3.1. Todos os reagentes utilizados nas reações foram preparados com água purificada por equipamento de osmose reversa e tratada com resina Chelex 100 para remoção de íons metálicos.

6.3.3.4 Análise da estabilidade dos marcadores moleculares

A) Análise da integridade dos peptídeos após a marcação

A estabilidade dos peptídeos frente à reação de marcação foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (método B), conforme descrito na seção 6.3.3.1 (B), uma hora após o fim das reações. Os perfis cromatográficos dos derivados que foram radiomarcados na ausência de metionina no meio foram comparados aos obtidos para os derivados não radiomarcados e para os radiomarcados na presença de 100 µg de metionina no meio de reação, a fim de avaliar a presença de espécies oxidadas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

B) Análise da estabilidade frente à radiólise: efeito dos agentes estabilizantes

Para avaliação do efeito de diferentes agentes estabilizantes, os marcadores moleculares produzidos na presença de metionina foram diluídos em solução salina contendo ácido ascórbico (10 mg/mL), ácido gentísico (10 mg/mL) ou etanol (10 % v/v) imediatamente após o fim da reação (concentração radioativa final 370 MBq/mL). As misturas foram incubadas à temperatura ambiente, retirando-se uma alíquota após 24, 48 e 72 horas para análise da pureza radioquímica por CCD e avaliação da presença de produtos de radiólise por CLAE (método B), conforme descrito anteriormente. A pureza

radioquímica e o perfil em CLAE dos marcadores moleculares produzidos na ausência e presença de metionina (0,5 mg/mL) e incubados em solução salina sem estabilizantes (concentração radioativa final 370 MBq/mL, 20 mCi/mL) também foram determinados em cada tempo.

C) Análise da estabilidade em soro humano “in vitro”

Para obtenção do soro humano, coletou-se 10 mL de sangue de doador sadio sem anticoagulante, centrifugou-se a 1400 g (1500 rpm) por 10 minutos, separou-se o coágulo de fibrina e centrifugou-se novamente para separação do soro.

Adicionou-se, em duplicata, 24 MBq (700 µCi) de cada marcador molecular a 1 mL de soro humano de doador sadio e incubou-se a 37 °C sob agitação de 350 rpm por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas. Decorrido o tempo, retirou-se uma alíquota das misturas (200 µL) para análise de uma pequena fração por CCD, conforme descrito anteriormente, e cálculo da porcentagem dos marcadores moleculares íntegros em cada tempo. Ao restante da alíquota, adicionou-se etanol (1:1 v/v) para precipitação das proteínas e centrifugou-se a 9720 g (10000 rpm). Coletou-se uma alíquota do sobrenadante e o precipitado e a radioatividade foi determinada no contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo. A porcentagem dos marcadores moleculares ligados às proteínas séricas (LP) foi determinada pela equação:

$$LP (\%) = \frac{cpm \text{ no precipitado}}{cpm \text{ no sobrenadante} + cpm \text{ no precipitado}} \times 100 \quad \text{EQ. 1}$$

O restante do sobrenadante foi diluído em solução fosfato-salina 0,1 M pH 7,4, filtrado em membrana 0,22 µm e analisado por CLAE, conforme descrito na seção 6.3.3.1 (método B).

6.3.3.5 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental dos marcadores moleculares

O coeficiente de partição dos marcadores moleculares foi determinado conforme descrito por Durkan e colaboradores⁹⁰, a fim de avaliar comparativamente sua lipofilicidade. Adicionou-se, em triplicata, 25 µL (12 MBq) dos marcadores moleculares a

um tubo contendo 3 mL de n-octanol (fase orgânica) e 3 mL de solução fosfato-salina pH 7,4 (PBS) (fase aquosa), pré-saturados por 24 horas. Agitou-se o tubo por uma hora à temperatura ambiente e, após a separação das fases aquosa e orgânica, coletou-se 10 µL da fase aquosa e 100 µL da fase orgânica para contagem em contador automático tipo poço. O coeficiente de partição (log P) foi determinado pela equação:

$$\log P = \log_{10} \frac{\text{cpm na fase orgânica}}{\text{cpm na fase aquosa} \times 10} \quad \text{EQ. 2}$$

6.3.3.6 Estudos farmacocinéticos em camundongos *BALB/c* sadios

Denomina-se farmacocinética a variação da concentração plasmática de um fármaco ou de seu metabólito em função do tempo após a administração, ou seja, as variações das concentrações dos fármacos nos diferentes fluidos e tecidos do organismo decorrentes do sistema dinâmico de liberação, absorção, distribuição, retenção, ligação, metabolismo e excreção⁹¹.

A análise da farmacocinética dos marcadores moleculares foi realizada por método não invasivo. Injetou-se, por via endovenosa caudal, 1,85 MBq (50 µCi, diluídos em 100 µL de solução de NaCl 0,9 %) de cada marcador molecular e, após diferentes tempos (1 minuto a 24 horas), coletou-se amostra de sangue (60 µL) pelo plexo orbital dos camundongos, utilizando um tubo capilar heparinizado. A radioatividade do sangue foi analisada em um contador gama tipo poço e os dados foram ajustados no programa GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) para um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento. Os parâmetros farmacocinéticos meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$), meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), constante de distribuição (α) e constante de eliminação (β), bem como a área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (AUC), foram calculados utilizando o mesmo programa. A depuração (CL) foi calculada pela equação:

$$CL = \frac{\text{Atividade total administrada}}{AUC} \quad \text{EQ. 3}$$

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela equação:

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \quad \text{EQ. 4}$$

6.3.3.7 Estudos de biodistribuição em camundongos *BALB/c* sadios

Os marcadores moleculares (1,85 MBq, 50 µCi, 0,01 nmol) diluídos em 100 µL de solução de NaCl 0,9 % foram administrados por via endovenosa caudal. Após 1, 4 ou 24 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os principais órgãos foram retirados, lavados e pesados, e avaliou-se a radioatividade em cada um deles, conforme descrito anteriormente. Calcularam-se as porcentagens da atividade injetada por tecido (% AI, EQ. 5) e por grama de tecido (% AI/g, EQ. 6) utilizando-se a média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

$$\% AI = \frac{cpm \text{ órgão}}{(cpm \text{ padrão} - cpm \text{ na cauda})} \times 100 \quad \text{EQ. 5}$$

$$\% AI/g = \frac{cpm \text{ órgão}}{\text{peso do órgão (g)} \times (cpm \text{ padrão} - cpm \text{ na cauda})} \times 100 \quad \text{EQ. 6}$$

Para cálculo da porcentagem de atividade injetada presente nos ossos (% AI/osso) e nos músculos (% AI/músculo) dos animais, retirou-se o fêmur e o músculo da coxa dos camundongos, calculou-se a porcentagem de atividade por grama e assumiu-se o peso do esqueleto como 12 % (EQ. 7) e dos músculos como 40 % (EQ. 8) do peso corpóreo do camundongo⁹².

$$\% AI (\text{osso total}) = \frac{cpm \text{ fêmur} \times 12 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do fêmur (g)} \times (cpm \text{ padrão} - cpm \text{ na cauda})} \quad \text{EQ. 7}$$

$$\% AI (\text{músculo total}) = \frac{cpm \text{ músculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do músculo (g)} \times (cpm \text{ padrão} - cpm \text{ na cauda})} \quad \text{EQ. 8}$$

6.3.3.8 Estudos de corpo inteiro em camundongos *BALB/c* sadios

A fim de prever a excreção e o tempo de residência no organismo dos marcadores moleculares derivados da bombesina, estudos de corpo inteiro foram

realizados em camundongos *BALB/c* sadios. Injetou-se, por via endovenosa caudal, 11 MBq (300 μ Ci, 0,05 nmol) dos marcadores moleculares diluídos em 100 μ L de solução salina 0,9 %. Decorridas 1, 4, 24, 48, 72 e 144 horas após administração, os animais foram induzidos a urinar, imobilizados e posicionados sob o colimador da gama câmara para determinação das contagens de eventos radioativos durante três minutos. Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade injetada presente no organismo e em porcentagem da atividade injetada eliminada em função do tempo, considerando-se como 100 % a média das contagens imediatamente após a administração. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

6.3.3.9 Cultivo celular

As células PC-3 de adenocarcinoma prostático humano grau IV (Hemocentro da Unicamp) foram cultivadas a 37 °C e 5 % de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico (penicilina:estreptomicina). Ao atingirem 80 % de confluência na placa de cultura, as células foram tripsinizadas e ressuspensas no meio adequado para implantação nos animais.

6.3.3.10 Estudos de biodistribuição em camundongos *Nude* com tumor PC-3

Para avaliar comparativamente a capacidade de ligação dos marcadores moleculares às células tumorais, fez-se necessário projetar um modelo *in vivo* de tumor prostático orientado pela técnica proposta por Lantry e colaboradores²⁰. Injetou-se 2 x 10⁶ células PC-3, derivadas de adenocarcinoma de próstata humano, ressuspensas em 100 μ L de uma mistura de PBS e matrigel alta concentração (2:1 v/v) por via subcutânea no dorso dos camundongos *Nude*.

Os estudos de biodistribuição foram realizados em triplicata, conforme descrito anteriormente para os camundongos *BALB/c*, três semanas após a injeção das células, quando a massa tumoral atingiu cerca de 0,3 g.

6.3.3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como Média (Amplitude) quando n = 2 ou Média $\pm$ Erro Padrão (ensaios *in vitro*) e Média $\pm$ Desvio Padrão (ensaios *in vivo*) n $\geq$ 3. A

análise estatística foi realizada através do programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando o teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação de pares e análise de variância ANOVA para comparação de grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.4.1 Desenvolvimento do método de radiomarcção dos derivados da bombesina com índio-111

6.4.1.1 Determinação da temperatura, massa, tempo e atividade de reação

O resultado da pureza radioquímica das reações, determinada por CCD após a radiomarcção do YG₅-DTPA com índio-111 a diferentes temperaturas, encontra-se na TAB. 8. O derivado foi obtido com alta pureza radioquímica em todas as temperaturas estudadas e a temperatura escolhida para os demais experimentos foi 25 °C. Apesar de já ter sido demonstrada a resistência de derivados da bombesina à marcação a altas temperaturas⁸², inclusive para série semelhante de derivados⁷⁷, a marcação à temperatura ambiente confere maior segurança tanto do ponto de vista do marcador molecular e suas estabilidade e integridade proteica, como do ponto de vista da aplicabilidade prática e requisitos de proteção radiológica do operador e do ambiente.

TABELA 8 – Variação da pureza radioquímica das reações (CCD) em função da temperatura em que 10 µg de DTPA-YG₅ e 18-22 MBq de ¹¹¹InCl₃ reagiram por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm e em pH 4,5 (n = 2).

Temperatura da Reação	Pureza Radioquímica (%)
25 °C	98,8 (0,4)
40 °C	98,8 (1,6)
55 °C	96,6 (1,8)

Determinada a temperatura ótima para as reações, procedeu-se à avaliação da massa de YG₅-DTPA a ser radiomarcada e os resultados são apresentados na FIG. 29. Apesar de massas maiores que 2,5 µg conferirem às reações pureza radioquímica satisfatória ($95,28 \pm 0,3$ % para 2,5 µg do derivado), esta foi significativamente maior ($96,86 \pm 0,2$ %, $p = 0,01438$) quando 10 µg de peptídeo foram utilizados na reação.

FIGURA 29 – Variação da pureza radioquímica da reação de marcação de acordo com a massa de peptídeo que reagiu com 18,5 MBq de $^{111}\text{InCl}_3$, por 30 minutos, a 25° C e agitação de 350 rpm ($n = 3$).

Determinadas as condições ideais de temperatura (25 °C) e massa de peptídeo (10 µg), procedeu-se à determinação do tempo de reação e os resultados são apresentados na TAB. 9. Não foi observada diferença significativa entre a pureza radioquímica das reações em todos os tempos estudados e alta pureza radioquímica foi obtida com apenas 5 minutos de reação. Por ser o tempo intermediário entre o mínimo e o máximo estudados, escolheu-se o tempo de 15 minutos como padrão para as demais reações.

TABELA 9 – Variação da pureza radioquímica das reações (CCD) em função do tempo em que 10 µg de DTPA-YG₅ e 18,5 MBq de ¹¹¹InCl₃ reagiram a 25 °C, sob agitação de 350 rpm e em pH 4,5 (n = 2).

Tempo da Reação (minutos)	Pureza Radioquímica (%)
5	96,8 (1,0)
10	97,0 (1,4)
15	97,7 (3,0)
20	97,9 (0,4)
25	97,1 (2,0)
30	97,1 (0,8)

Fixou-se, por sua vez, a temperatura em 25 °C, a massa de YG₅-DTPA em 10 µg e o tempo de reação em 15 minutos para que o efeito da atividade crescente de ¹¹¹InCl₃ sobre a pureza radioquímica das reações fosse estudado. A título de comparação, esses estudos foram também realizados com a massa de 2,5 µg, que foi a massa mínima que conferiu pureza radioquímica satisfatória nas reações com 18,5 MBq de ¹¹¹InCl₃. Os resultados dessas análises, determinados por CCD e CLAE, e a atividade específica calculada do marcador molecular obtido são mostrados na TAB. 10. Pode-se observar que pureza radioquímica satisfatória (> 95 %) e altas atividades específicas foram obtidas quando a massa de peptídeo na reação foi 10 µg.

Os estudos das reações de radiomarcagem são importantes por possibilitar estabelecer a relação atividade de ¹¹¹InCl₃:massa de peptídeo (MBq/µg ou mCi/µg) que confere maior pureza radioquímica ao produto radiomarcado. Essa relação será útil para a extrapolação da condição ótima de marcação para reações envolvendo atividades maiores de cloreto de índio-111, compatíveis com a produção do radiofármaco para aplicações clínicas.

TABELA 10 – Efeito da atividade crescente de radionuclídeo sobre a pureza radioquímica da reação de marcação do YG₅-DTPA com ¹¹¹InCl₃.

Massa de YG ₅ -DTPA (μg)	Atividade de ¹¹¹ InCl ₃ (MBq / mCi)	Pureza Radioquímica do YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (%) (CCD)	Pureza Radioquímica do YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (%) (CLAE)	Atividade Específica do YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In (GBq/μmol)	(n)
2,5	18,5 / 0,5	95,3 ± 0,3	nd	13,9	3
2,5	74 / 2,0	92,7 ± 0,3	nd	55,6	2
2,5	111 / 3,0	84,0 (2,8)	nd	83,4	2
2,5	148 / 4,0	83,1 (0,8)	nd	111,2	2
10	18,5 / 0,5	96,9 ± 0,1	98,4 ± 0,3	3,5	3
10	37 / 1,0	96,7 (0,4)	97,5 (0,8)	6,9	2
10	55,5 / 1,5	96,7 (1,0)	nd	10,4	2
10	74 / 2,0	97,6 ± 0,8	99,0 ± 0,4	13,9	3
10	92,5 / 2,5	96,9 ± 0,2	nd	17,4	3
10	111 / 3,0	97,2 ± 0,6	93,3 ± 7,2	20,9	3
10	148 / 4,0	97,5 (0,4)	98,9 (1,0)	27,8	2
10	185 / 5,0	97,9 (2,4)	98,1 (2,0)	34,8	2
10	296 / 8,0	97,7 (0,4)	98,0 (1,2)	55,6	2
10	555 / 15,0	95,2 (0,2)	nd	104,3	2
10	832 / 22,5	96,0 (0,8)	nd	156,5	2
10	925 / 25,0	97,2 (2,0)	96,4 (0,8)	174,0	2
10	1110 / 30,0	92,3 (1,8)	nd	209,0	2

nd = não determinado

A atividade de $^{111}\text{InCl}_3$ incorporada por mol de peptídeo, ou seja, a atividade específica do marcador molecular é uma grandeza importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos radiofármacos. Radiofármacos de baixa atividade específica tem baixo valor do ponto de vista da aplicação clínica, uma vez que as moléculas não marcadas competem com as marcadas pela ligação aos receptores *in vivo*, além de provocarem toxicidade decorrente dos efeitos fisiológicos provocados por essa ligação. Em contrapartida, atividade específica muito alta pode provocar radiólise e, no caso específico de proteínas marcadas, desnaturação⁹³. A atividade específica dos derivados da bombesina radiomarcados com índio-111 descritos pela literatura é variável, estando em sua maioria compreendida entre 480 MBq/ μmol ⁵⁵ e 270 GBq/ μmol ^{61; 82}. Considerando-se esta faixa, a atividade específica obtida para o marcador molecular YG₅-DTPA- ^{111}In pode ser considerada alta e adequada para a aplicação em estudos pré-clínicos e clínicos.

Os resultados da análise da radiomarcação por CCD foram confirmados pela CLAE (TAB. 10 e FIG. 30). O marcador molecular produzido com diferentes atividades específicas foi eluído em uma coluna de fase reversa C₁₈, com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH₃CN (1:1000 v/v) em TFA:H₂O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos (método A). Nesse sistema, o índio não ligado (FIG. 30H) foi facilmente separado do marcador molecular pela diferença entre seus tempos de retenção (TR). Os radiocromatogramas do marcador molecular (FIG. 30A-G) não mostraram o $^{111}\text{InCl}_3$ livre como contaminante, resultado da alta pureza radioquímica das marcações. O TR do marcador molecular YG₅-DTPA- ^{111}In nesse sistema foi 6,70 + 0,02 minutos e o do $^{111}\text{InCl}_3$ foi 1,05 ± 0,05 minutos.

FIGURA 30 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular $\text{YG}_5\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ de atividade específica 3,5 (A); 6,9 (B); 13,9 (C_1 e C_2); 20,9 (D_1 e D_2); 27,8 (E); 34,8 (F) e 55,6 $\text{GBq}/\mu\text{mol}$ (G) e do $^{111}\text{InCl}_3$ (H) em CLAE, utilizando-se uma coluna C_{18} e o método A. Os números 1 e 2, ao lado de algumas das letras na figura, indicam cromatogramas obtidos em dias diferentes.

A análise por CLAE também revelou a existência de uma segunda espécie radioativa em alguns dos cromatogramas do marcador molecular YG₅-DTPA-¹¹¹In (FIG. 30B, 30C₁ e 30D₁), ausente no perfil em CLAE do derivado não radiomarcado utilizando sistema de detecção UV a 280 nm (FIG. 31) e com tempo de retenção ligeiramente menor do que o marcador molecular ($5,77 \pm 0,04$ minutos). A formação dessa segunda espécie foi investigada e os resultados encontram-se descritos no item 6.4.1.2.

FIGURA 31 – Perfil de CLAE (UV) do derivado da bombesina YG₅-DTPA em uma coluna de fase reversa C₁₈, com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH₃CN (1:1000 v/v) em TFA:H₂O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. O tempo de retenção do peptídeo foi 6,55 minutos.

Com base nos resultados descritos anteriormente, determinou-se como reação padrão de marcação aquela em que se reage 10 µg de derivado da bombesina com até 25 mCi (925 MBq) de ¹¹¹In em pH 4,5, a 25 °C, por 15 minutos e em um volume de 200 µL. Essa condição e suas razões 1/5 ou 1/10 foram utilizadas para obter marcadores moleculares para os demais experimentos.

6.4.1.2 Avaliação da oxidação da metionina

Segundo a literatura consultada, a oxidação da metionina (Met) à metionina sulfóxido (Met-O) dá origem a uma espécie com tempo de retenção menor do que o

peptídeo radiomarcado não oxidado⁶². Essa forma oxidada já foi descrita como produto primário da degradação de outros derivados da bombesina, representando cerca de 10 % da radioatividade total^{60; 62} e pode ser resultante do processo de marcação. Esse processo de oxidação pode ser evitado pela adição de um agente estabilizante à reação de marcação^{60; 62} ou pela substituição deste aminoácido por um aminoácido sintético, como a norleucina⁹⁴. Dentre os agentes estabilizantes possíveis estão compostos naturais de selênio, tais como a selênio-metionina, a selênio-cisteína, e agentes redutores sulfurados, tais como o 2-mercaptoetanol, o ditioneitol e o ácido 1-pirrolidinocarboditióico. Chen e colaboradores⁶² estudaram o efeito desses agentes estabilizantes sobre a formação de Met-O na reação de marcação do AMBA-¹⁷⁷Lu e mostraram que todos são efetivos para esse propósito. Nesse contexto, a fim de avaliar se o segundo pico observado nos radiocromatogramas do YG₅-DTPA-¹¹¹In (FIG. 30) corresponde ao marcador molecular oxidado, procedeu-se à reação padrão de radiomarcção na ausência e na presença de 0,5 e 5 mg/mL de metionina. Os resultados da análise de pureza radioquímica (CCD) do marcador molecular obtido nas três condições estudadas são apresentados nas TAB. 11. A presença de metionina 0,5 mg/mL no meio de reação não altera significativamente a pureza radioquímica da reação padrão de marcação, mas o aumento de sua quantidade no meio de reação para 5 mg/mL comprometeu a pureza do marcador molecular obtido.

TABELA 11 – Variação da pureza radioquímica das reações (CCD) em função da presença de metionina na reação padrão de marcação do YG₅-DTPA (n = 3).

Condição da reação padrão de marcação	Pureza Radioquímica (%)
Sem metionina	96,86 ± 0,5
Com metionina (0,5 mg/mL)	96,07 ± 1,2
Com metionina (5 mg/mL)	91,93 ± 0,6

O resultado da avaliação da oxidação do marcador molecular YG₅-DTPA-¹¹¹In por CLAE é apresentado na FIG. 32. A presença de metionina não impediu o aparecimento do segundo pico (TR = 5,77 + 0,04 minutos) e não alterou significativamente sua proporção no meio de reação (de 2 a 4 % do total de atividade no meio). Esse resultado sugere que a metionina pode não ter sido adicionada em excesso suficiente para prevenir

totalmente a oxidação. Entretanto, assim como a análise por cromatografia em camada delgada, a CLAE confirmou que a adição de 5 mg/mL de metionina no meio compromete a pureza radioquímica da reação de marcação, aumentando a porcentagem de índio-111 livre ($TR = 1,05 \pm 0,05$ minutos), e não diminui significativamente a proporção do segundo pico no meio de reação, sugerindo que o mínimo de oxidação pode ter sido alcançado com 0,5 mg/mL de metionina no meio.

FIGURA 32 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C_{18} 150 mm x 4,0 mm, 5 μ m; método A) representativo do marcador molecular $YG_5-DTPA-^{111}In$ (atividade específica 174 GBq/ μ mol) obtido na ausência (A) e na presença de 0,5 (B) e 5 mg/mL (C) de metionina no meio de reação.

6.4.2 Radiomarcção dos derivados da bombesina com ^{111}In

Na TAB. 12 apresentam-se os resultados da radiomarcção dos derivados da bombesina com índio-111, na condição padrão de marcação e na ausência e presença de 0,5 mg/mL de metionina. Os dados mostram que os parâmetros definidos anteriormente foram aplicados com sucesso a todos os derivados. Todos foram radiomarcados com alta pureza radioquímica (> 95 %), não sendo necessário procedimento de purificação dos marcadores moleculares para realização dos demais estudos. Além disso, a adição de 0,5 mg/mL de metionina para prevenir a formação de espécies oxidadas não comprometeu a pureza radioquímica dos marcadores moleculares obtidos.

TABELA 12 – Pureza radioquímica após a radiomarcção dos derivados da bombesina nas condições padrão de marcação (174 GBq/ μmol ; n = 6). A pureza radioquímica foi analisada por CCD.

Marcador Molecular	Massa Molar do Derivado (g/mol)	Pureza Radioquímica (%)	
		Sem metionina	Com metionina (0,5 mg/mL)
YG ₃ -DTPA- ^{111}In	1765,0	97,33 $\pm$ 0,8	96,09 $\pm$ 1,3
YG ₅ -DTPA- ^{111}In	1879,1	96,53 $\pm$ 1,6	96,06 $\pm$ 0,5
YG ₅ N-DTPA- ^{111}In	1858,8	97,77 $\pm$ 0,1	97,59 $\pm$ 0,4

6.4.3 Análise da estabilidade dos marcadores moleculares

6.4.3.1 Análise da integridade dos peptídeos após a marcação

A análise da integridade dos marcadores moleculares por CLAE 1 hora após a radiomarkação é apresentada na FIG. 33. Os derivados foram eluídos em uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,0 mm, 5 µm), com um gradiente linear de 10 a 40 % (v/v) de TFA:CH₃CN (1:1000 v/v) em TFA:H₂O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,0 mL/minuto por 20 minutos, retornando ao estado inicial por 5 minutos para estabilização do sistema (método B). Nesse sistema, o índio não ligado foi facilmente separado dos marcadores moleculares pela diferença entre seus TR. Os radiocromatogramas dos marcadores moleculares (FIG. 33) mostraram apenas uma pequena fração de ¹¹¹InCl₃ (TR = 1,60 ± 0,07 minutos) nas misturas de reação (< 2 %), resultado da alta pureza radioquímica das marcações, anteriormente evidenciada pela cromatografia em camada delgada.

A análise por CLAE também revelou a existência de outras espécies radioativas no esquema dos cromatogramas dos marcadores moleculares (FIG. 33), ausentes no perfil de CLAE dos derivados não radiomarcados utilizando sistema de detecção UV a 280 nm (FIG. 34) e com tempos de retenção ligeiramente menores do que os peptídeos radiomarcados. O aparecimento dessas espécies não foi evitado pela adição de metionina ao meio de reação, sugerindo não ser decorrente da formação de espécies oxidadas. Apesar de representarem prováveis impurezas no meio de reação, sua proporção é pouco significativa em relação ao marcador molecular. Impurezas semelhantes foram recentemente evidenciadas por Schroeder e colaboradores⁶¹ na marcação de quatro derivados da bombesina (P2653, MP2346, Pesin e AMBA) com ¹¹¹In e da Demobesin-1 com ^{99m}Tc e não comprometeram a utilização desses derivados nos demais estudos.

FIGURA 33 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C_{18} 150 mm x 4,0 mm, 5 μ m; método B) dos marcadores moleculares (174 GBq/ μ mol) YG_3 -DTPA- ^{111}In (A e B), YG_5 -DTPA- ^{111}In (C e D) e $YG_5\text{N}$ -DTPA- ^{111}In (E e F) obtidos na ausência (A, C e E) e na presença de 0,5 mg/mL de metionina (B, D e F) no meio de reação. Os números indicados na figura correspondem ao tempo de retenção, em minutos, da espécie representada pelo pico correspondente.

FIGURA 34 – Perfil de CLAE dos derivados da bombesina YG₃-DTPA (A), YG₅-DTPA (B) e YG₅N-DTPA (C), utilizando-se uma coluna C₁₈, com um gradiente linear de 10 a 40 % de TFA:CH₃CN (1:1000 v/v) em TFA:H₂O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,0 mL/minuto por 20 minutos (método B) e sistema de detecção UV.

Os tempos de retenção dos derivados da bombesina e dos marcadores moleculares correspondentes, mostrados na TAB. 13, podem ser utilizados para análise comparativa de sua lipofilicidade. Na cromatografia em fase reversa, considerando-se o mesmo gradiente de solventes e a mesma fase estacionária (coluna C₁₈), a espécie mais lipossolúvel é aquela que apresenta maior tempo de retenção. Pelos resultados obtidos, verificou-se que o aumento no tamanho do espaçador reduz discretamente a lipofilicidade dos derivados da bombesina e a substituição da metionina terminal pelo aminoácido sintético norleucina aumenta sua lipofilicidade. Esse resultado experimental confirma a tendência anteriormente mostrada pelos cálculos teóricos de coeficiente de partição (log P) dos derivados da bombesina. Apesar do aumento no tamanho do espaçador representar um aumento na cadeia carbônica dos derivados, a redução observada na lipossolubidade do YG₅-DTPA em relação ao YG₃-DTPA indica que a adição do aminoácido glicina à sequência de aminoácidos do espaçador aumenta sua polaridade.

TABELA 13 – Tempos de retenção do cloreto de índio-111, dos derivados da bombesina não radiomarcados e dos marcadores moleculares em CLAE utilizando o método B (n = 3). Os tempos de retenção apresentados correspondem à espécie principal nos cromatogramas.

Espécie Química		Tempo de Retenção em CLAE (minutos)
¹⁷⁷ InCl ₃		1,67 ± 0,07
Derivado da BBN	Não radiomarcado	Marcador molecular
YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In	15,07 ± 0,00	15,33 ± 0,00
YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In	14,89 ± 0,00	15,06 ± 0,00
YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	15,84 ± 0,00	16,17 ± 0,00

Os aminoácidos individuais são classificados de acordo com vários critérios, dos quais a natureza polar ou apolar da cadeia lateral é particularmente importante. A glicina (Gly, FIG. 35) é o aminoácido mais simples e sua cadeia lateral é composta de apenas um átomo de hidrogênio. Em alguns esquemas de classificação, essa cadeia lateral é considerada do tipo polar eletricamente neutra, porque lhe falta uma cadeia lateral

apolar e, em outros, como apolar, já que a glicina não possui cadeia lateral polar. Já a tirosina (Tyr, FIG. 36) apresenta cadeia lateral polar neutra, composta por um radical que tende a formar ligação de hidrogênio⁹⁵. O aumento no número de aminoácidos glicina ligados a um aminoácido tirosina reduziu discretamente a lipofilicidade dos derivados da bombesina, sugerindo que a cadeia lateral da glicina confere caráter polar aos espaçadores dos derivados.

FIGURA 35 – Estrutura do aminoácido glicina.

FIGURA 36 – Estrutura do aminoácido tirosina.

Conforme dito anteriormente, a substituição da metionina terminal do YG₅-DTPA pelo aminoácido sintético norleucina no YG₅N-DTPA aumentou a lipofilicidade do derivado. A metionina (Met, FIG. 37) é um aminoácido apolar, com cadeia lateral formada por um hidrocarboneto modificado. A norleucina (Nle, FIG. 38) é um análogo sintético da metionina cuja cadeia lateral apolar é um hidrocarboneto que não possui o enxofre em sua estrutura. Essa diferença faz da norleucina um aminoácido mais apolar do que a metionina e a substituição tem sido uma prática comumente adotada a fim de evitar a oxidação do peptídeo via oxidação da metionina a metionina sulfóxido⁹⁴.

FIGURA 37 – Estrutura do aminoácido metionina.

FIGURA 38 – Estrutura do aminoácido sintético norleucina.

6.4.3.2 Análise da estabilidade frente à radiólise: efeito dos agentes estabilizantes

Radiofármacos emissores α^{2+} ou β^{-} frequentemente sofrem radiólise durante a preparação e armazenamento. Durante a radiólise, as emissões radioativas podem atingir a molécula radiomarcada, provocando sua decomposição ou quebra⁹⁶. Embora estes efeitos sejam mais pronunciados em radiofármacos aplicados em terapia, radioisótopos de diagnóstico, como o índio-111, não emitem apenas fótons, mas também elétrons Auger, que podem ter efeito de partículas. Uma vez que a eficácia in vivo dos derivados da bombesina é, em grande parte, dependente da ligação aos receptores nas células tumorais, a radiólise pode comprometer essa ligação e aumentar a dose de radiação aos tecidos normais, prejudicando o diagnóstico. Por conseguinte, há a necessidade de se utilizar um agente para estabilizar os marcadores moleculares e evitar sua radiólise.

A estabilidade dos marcadores moleculares frente à radiólise foi analisada por CCD e CLAE após armazenamento à temperatura ambiente (370 MBq/mL) por até 72 horas na ausência e presença de agentes estabilizantes⁹⁷. Os resultados de CCD (TAB. 14) sugerem que os marcadores moleculares apresentam alta estabilidade nas condições estudadas e que essa estabilidade foi aumentada pela adição de agentes estabilizantes, especialmente pelo etanol.

TABELA 14 – Estabilidade dos marcadores moleculares após armazenamento à temperatura ambiente, determinada por CCD (n = 3).

Agente Estabilizante	Porcentagem de espécie radioquímica com R _f 0,0-0,1 (%)								
	YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	horas	horas	horas	horas	horas	horas	horas	horas	horas
Sem estabilizante	92,7 ± 0,6	82,4 ± 0,7	82,8 ± 0,1	92,3 ± 1,1	93,3 ± 5,7	82,0 ± 3,5	85,8 ± 1,1	79,0 ± 1,3	64,3 ± 5,2
Metionina da reação	95,9 ± 0,3	92,7 ± 0,8	92,4 ± 0,7	95,4 ± 0,6	88,1 ± 0,4	84,5 ± 1,1	91,9 ± 4,9	90,5 ± 3,1	85,6 ± 1,3
Ácido ascórbico (10 mg/mL)	96,6 ± 0,2	95,0 ± 0,1	94,6 ± 0,2	94,6 ± 0,6	94,9 ± 1,1	95,8 ± 0,5	96,1 ± 0,1	92,9 ± 0,1	89,6 ± 0,2
Etanol (10 % v/v)	95,8 ± 0,6	95,6 ± 0,5	94,5 ± 3,1	97,1 ± 0,1	94,9 ± 0,7	96,7 ± 0,1	97,7 ± 0,2	97,7 ± 0,2	95,7 ± 0,5
Ácido gentísico (10 mg/mL)	97,3 ± 0,1	93,9 ± 0,8	93,6 ± 0,1	95,9 ± 1,6	97,1 ± 0,8	93,4 ± 0,5	90,3 ± 0,8	86,6 ± 2,5	78,5 ± 4,0

Entretanto, ao se analisar os resultados de porcentagem de espécie com tempo de retenção correspondente ao marcador molecular intacto por CLAE (TAB. 15), observa-se que os agentes estabilizantes estudados promoveram aumento significativo da estabilidade dos marcadores moleculares, mas não foram suficientes para evitar totalmente a sua radiólise. Essas diferenças entre os resultados de CCD e CLAE provavelmente se devem à incapacidade da CCD de separar os compostos intermediários, observados em CLAE, do marcador molecular íntegro.

TABELA 15 – Estabilidade dos marcadores moleculares após armazenamento à temperatura ambiente (n = 3), determinada por CLAE.

Condição de Armazenamento	Porcentagem de espécie com TR correspondente ao marcador molecular intacto (%)								
	YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	horas	horas	horas	horas	horas	horas	horas	horas	horas
Sem estabilizante	95,9 ± 1,0	0,00	0,00	21,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,00	17,0 ± 1,2	1,3 ± 0,2	0,00
Metionina da reação	99,0 ± 0,8	86,1 ± 1,2	75,98 ± 0,9	18,9 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,00	69,6 ± 0,6	37,7 ± 0,3	15,1 ± 1,8
Ácido ascórbico (10 mg/mL)	95,9 ± 0,4	90,3 ± 0,3	83,11 ± 1,1	88,6 ± 1,3	75,0 ± 0,5	74,6 ± 0,7	89,8 ± 1,0	83,2 ± 1,4	75,1 ± 0,7
Etanol (10 % v/v)	97,6 ± 0,6	96,3 ± 0,4	82,16± 0,3	91,7 ± 0,3	83,3 ± 0,9	70,2 ± 1,0	94,4 ± 0,8	88,5 ± 0,9	88,7 ± 1,9
Ácido gentísico (10 mg/mL)	95,5 ± 0,7	93,9 ± 2,5	90,89 ± 0,3	75,1 ± 0,5	58,0 ± 1,2	47,6 ± 0,5	78,9 ± 1,7	72,7 ± 1,2	54,7 ± 2,8

Considerando-se o perfil de CLAE, na ausência de estabilizantes, observa-se que a radiólise dos marcadores moleculares dá origem a uma série de espécies de TR intermediários entre o ¹¹¹InCl₃ e o marcador molecular íntegro (FIG. 39, 40 e 41). Na presença de quaisquer dos agentes estabilizantes estudados, a radiólise é significativamente mais lenta e dá origem a uma única espécie intermediária (TR 12,22 minutos) para os derivados YG₃-DTPA-¹¹¹In e YG₅-DTPA-¹¹¹In, a qual não é observada no perfil do YG₅N-DTPA-¹¹¹In para o mesmo tempo e mesmo agente estabilizante (FIG. 41).

FIGURA 39 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular $YG_3\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ (174 GBq/ μmol) após armazenamento em solução salina (concentração final 370 MBq/mL) à temperatura ambiente por diferentes tempos na ausência de estabilizante (A) ou na presença de metionina da reação (B), ácido ascórbico 10 mg/mL (C), etanol 10 % v/v (D) ou ácido gálico 10 mg/mL (E) no meio de reação.

FIGURA 40 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular YG₅-DTPA-¹¹¹In (174 GBq/μmol) após armazenamento em solução salina (concentração final 370 MBq/mL) à temperatura ambiente por diferentes tempos na ausência de estabilizante (A) ou na presença de metionina da reação (B), ácido ascórbico 10 mg/mL (C), etanol 10 % v/v (D) ou ácido genticóico 10 mg/mL (E) no meio de reação.

FIGURA 41 – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ ($174 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) após armazenamento em solução salina (concentração final 370 MBq/mL) à temperatura ambiente por diferentes tempos na ausência de estabilizante (A) ou na presença de metionina da reação (B), ácido ascórbico 10 mg/mL (C), etanol $10 \% \text{ v/v}$ (D) ou ácido gáltico 10 mg/mL (E) no meio de reação.

Vários agentes estabilizantes já foram descritos para evitar radiólise em formulações radiofarmacêuticas. Os estudos demonstram que compostos como ácido ascórbico, ácido gáltico e metionina são estabilizantes eficazes em algumas aplicações^{62; 96; 98}. No entanto, estes agentes, por si só, não protegeram totalmente $\text{YG}_3\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$, $\text{YG}_5\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ e $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ da radiólise, mas aumentaram significativamente a sua estabilidade à temperatura ambiente por até 72 horas de

armazenamento ($p < 0,001$) .

O grau de dano radiolítico observado pode ser dependente da concentração radioativa, da atividade específica e do tipo de radiação ionizante emitida pelo radioisótopo. Além disso, a eficácia de um estabilizante também depende da sensibilidade de diversos grupos funcionais na molécula alvo⁶². Apesar da semelhança entre suas estruturas, após 72 horas de armazenamento, o ácido gentísico apresentou um maior efeito estabilizante para o marcador molecular $YG_3\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$, o ácido ascórbico apresentou um maior efeito estabilizante para o $YG_5\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ e o etanol apresentou um maior efeito estabilizante para o $YG_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$. Estas diferenças não foram observadas após 24 horas de armazenamento, quando maior efeito estabilizante foi observado com o etanol para os três marcadores moleculares. Além disso, $YG_3\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ apresentou uma estabilidade significativamente maior ($p < 0,05$) do que $YG_5\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ e $YG_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ em todas as condições e os tempos analisados e, em contraste com os resultados obtidos para estes dois últimos marcadores moleculares, a metionina apresentou efeito estabilizante significativo para $YG_3\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$. Assim, pequenas alterações no espaçador dos derivados bombesina promoveram diferenças consideráveis na estabilidade dos marcadores moleculares produzidos, bem como no efeito dos agentes estabilizantes sobre essa estabilidade.

A oxidação do resíduo de metionina tem sido descrita como o principal produto de radiólise de derivados da bombesina e a capacidade de ligação desses derivados aos receptores pode ser totalmente inativada por esta oxidação⁶². Os resultados descritos anteriormente demonstraram uma degradação mínima dos marcadores moleculares durante a radiomarcagem, em que uma espécie com um tempo de retenção de 12,22 minutos foi identificada como o principal produto de degradação (FIG. 33). Esta espécie também foi observada como o produto principal da radiólise dos marcadores moleculares $YG_3\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ e $YG_5\text{-DTPA-}^{111}\text{In}$ na presença dos agentes estabilizantes. Embora a formação desta espécie não tenha sido evitada pela adição de metionina ao meio de reação, ela não foi observada nas preparações do marcador molecular $YG_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$, no qual a metionina terminal foi substituída pelo aminoácido sintético norleucina. Esse resultado sugere que a espécie com TR de 12,22 minutos está relacionada com a metionina terminal e pode representar as espécies oxidadas. Neste caso, o excesso de metionina no meio foi insuficiente para prevenir a oxidação do $YG_3\text{-}$

DTPA-¹¹¹In e YG₅-DTPA-¹¹¹In. Apesar da presença dessa espécie oxidada (TR 12,22 minutos), ela representa apenas uma pequena porcentagem das preparações no final da marcação, o que manteve a sua pureza radioquímica superior a 90 %, adequados para as avaliações pré-clínicos.

6.4.3.3 Análise da estabilidade em soro humano *in vitro*

Para análise da estabilidade em soro humano, os marcadores moleculares foram diluídos em soro humano fresco e os perfis cromatográficos em CCD e CLAE foram examinados, após 15 minutos, 1, 4 e 24 horas de incubação a 37 °C, e utilizados para calcular a porcentagem dos marcadores moleculares íntegros em cada tempo. Os resultados são mostrados na TAB. 16. Apesar de após 24 horas apenas uma pequena porcentagem dos marcadores moleculares ainda permanecer intacta, a estabilidade desses peptídeos é maior do que a da bombesina nativa, a qual apresenta meia-vida de apenas 30 minutos em soro *in vitro*⁹⁹.

TABELA 16 – Estabilidade dos marcadores moleculares em soro humano *in vitro* a 37 °C, determinado por CCD (n = 4) e CLAE (n = 2).

Porcentagem de espécie radioquímica com R _f 0,0-0,1 (CCD) e TR correspondente ao marcador molecular intacto após incubação em soro humano a 37 °C (%)								
Marcador Molecular	15 minutos		1 hora		4 horas		24 horas	
	CCD	CLAE	CCD	CLAE	CCD	CLAE	CCD	CLAE
YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In	89,35 ±	79,13	73,02 ±	54,05	43,73 ±	13,11	5,70 ±	0,00
	1,3	(1,3)	3,0	(0,8)	1,4	(0,4)	0,6	(0,0)
YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In	92,48 ±	86,56	83,86 ±	76,66	64,48 ±	46,35	10,13 ±	0,17
	0,5	(2,1)	1,6	(3,2)	1,9	(1,1)	0,9	(0,2)
YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	95,38 ±	95,34	91,25 ±	87,01	76,64 ±	56,85	9,82 ±	5,59
	0,2	(1,7)	1,6	(2,5)	5,0	(2,3)	0,7	(1,0)

Os resultados das análises dos marcadores moleculares por CLAE após incubação em soro humano por diferentes tempos são apresentados nas FIG. 42, 43 e 44. Os marcadores sofrem ação das enzimas do soro, dando origem a espécies com tempos de retenção diferentes do marcador molecular íntegro. Essas espécies podem ser originadas da quebra na cadeia de aminoácidos dos derivados da bombesina (espécies correspondentes a tempos de retenção intermediários) e/ou do desligamento do DTPA-¹¹¹In do marcador molecular e do ¹¹¹In livre, espécie(s) predominante(s) após 24 horas de incubação.

FIGURA 42 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C_{18} 150 mm x 4,0 mm, 5 μ m; método B) representativo do YG_3 -DTPA- ^{111}In (174 GBq/ μ mol) após incubação em soro humano por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D).

FIGURA 43 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 µm; método B) representativo do YG₅-DTPA-¹¹¹In (174 GBq/µmol) após incubação em soro humano por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D).

FIGURA 44 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 µm; método B) representativo do YG₅N-DTPA-¹¹¹In (174 GBq/µmol) após incubação em soro humano por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D).

Zhang e colaboradores²¹ identificaram três metabólitos originários do análogo da bombesina BZH1 – GABA-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Thi¹³; Nle¹⁴]-BBN(6-14)-DTPA – radiomarcado com ¹¹¹In após sua incubação em soro humano. Esses metabólitos eram produtos da clivagem entre os aminoácidos β-Ala¹¹ e His¹² e da posterior decomposição do produto radioativo em DTPA-¹¹¹In e em outro produto radioativo decorrente da clivagem entre os aminoácidos Gln e Trp. Os metabólitos originários do análogo BZH2-¹¹¹In – GABA-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Thi¹³; Nle¹⁴]-BBN(6-14)-DOTA-¹¹¹In – incubado nas mesmas condições eram semelhantes, indicando que não há influência do agente quelante sobre a atividade enzimática *in vitro*. Apesar da ligação β-Ala-His não ser encontrada nos derivados estudados neste trabalho, a ligação Gln-Trp faz parte da sequência da bombesina do aminoácido 6 ao aminoácido 14 e está presente em todos os derivados estudados, podendo ser um dos pontos da clivagem enzimática observada *in vitro*. Outro ponto de clivagem pode ser a ligação Tyr-DTPA-¹¹¹In, dando origem ao produto DTPA-¹¹¹In.

Os dados contidos na TAB. 16 e os perfis apresentados nas FIG. 42, 43 e 44 demonstram que o aumento no número de aminoácidos glicina do espaçador aumenta significativamente ($p < 0,05$) a estabilidade metabólica do marcador molecular até 4 horas de incubação. Esse aumento é potencializado pela substituição da metionina terminal pelo aminoácido sintético norleucina, conforme já demonstrado por Garayoa e colaboradores⁹⁹. Essa maior estabilidade em soro *in vitro* pode significar maior estabilidade *in vivo* e, conseqüentemente, maior ligação às células-alvo e melhor relação tecidos-alvo/não alvo nos estudos de biodistribuição.

Os resultados da ligação dos marcadores moleculares às proteínas séricas *in vitro* após a incubação a 37 °C por diferentes tempos é apresentado na TAB. 17. Apenas uma pequena fração dos marcadores moleculares se liga às proteínas *in vitro* e essa fração não se altera significativamente com o tempo. A baixa ligação às proteínas sugere clareamento e biodistribuição rápidos *in vivo*. É importante ressaltar que a rápida eliminação do sangue é fundamental para evitar o metabolismo dos marcadores moleculares pelas enzimas do soro *in vivo*, conforme demonstrado *in vitro*.

TABELA 17 – Ligação dos marcadores moleculares derivados da bombesina às proteínas séricas *in vitro* (n = 2).

Porcentagem do marcador molecular ligado às proteínas séricas (%)				
Marcador Molecular	15 minutos	1 hora	4 horas	24 horas
YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In	2,04 (0,4)	1,94 (0,2)	2,24 (1,0)	2,87 (0,4)
YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In	2,97 (1,6)	1,90 (0,4)	2,73 (0,2)	2,91 (0,2)
YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	2,09 (0,2)	2,01 (0,4)	2,17 (0,2)	2,64 (0,2)

6.4.4 Determinação do coeficiente de partição experimental dos marcadores moleculares (log P)

Os coeficientes de partição experimentais dos marcadores moleculares são mostrados na TAB. 18. Não foram observadas diferenças significativas entre o coeficiente de partição dos marcadores moleculares e todos apresentam baixa lipofilicidade. Entretanto, observa-se uma tendência, semelhante à anteriormente mostrada pelos coeficientes de partição teóricos e pela análise em CLAE, em que o aumento do espaçador reduz discretamente a lipofilicidade do derivado da bombesina, apesar do aumento na cadeia carbônica, e a substituição da metionina terminal pelo aminoácido sintético norleucina aumenta a lipofilicidade do marcador molecular.

TABELA 18 – Coeficiente de partição (log P) óleo:água (n-octanol:PBS) experimental dos marcadores moleculares derivados da bombesina (n = 6).

Coeficiente de Partição Experimental (log P)			
Derivado	YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In
log P	-3,48 ± 0,1	-3,93 ± 0,2	-3,58 ± 0,2

6.4.5 Estudos farmacocinéticos em camundongos *BALB/c* sadios

As curvas de clareamento sanguíneo dos marcadores moleculares podem ser visualizadas na FIG. 45 em porcentagem da atividade injetada por mililitro de sangue (% AI/mL) em função do tempo após a administração. Pode-se observar que YG₃-DTPA-¹¹¹In, YG₅-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DTPA-¹¹¹In apresentam rápido clareamento sanguíneo.

FIGURA 45 – Curva de clareamento sanguíneo dos marcadores moleculares em camundongos *BALB/c* (n = 5).

As curvas da FIG. 45 foram utilizadas para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos dos marcadores moleculares, os quais são apresentados na TAB. 19. Os parâmetros foram calculados após ajuste dos dados para um modelo de decaimento exponencial em duas fases ou modelo de distribuição bicompartimental.

Os resultados de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da fase exponencial rápida e de depuração, ou seja, eficácia do organismo em eliminar o radiofármaco, sugerem rápido clareamento sanguíneo e rápida excreção, respectivamente. Além disso, YG₃-DTPA-¹¹¹In apresenta clareamento sanguíneo mais lento em relação a YG₅-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DTPA-¹¹¹In. Apesar da baixa estabilidade em soro humano *in vitro*, a rápida eliminação do sangue é fundamental para evitar o metabolismo dos marcadores moleculares pelas enzimas do soro *in vivo*, conforme demonstrado *in vitro*, e garantir sua ligação aos

receptores e aplicabilidade no diagnóstico de tumores que superexpressam os receptores BB₂.

TABELA 19 – Parâmetros farmacocinéticos para os marcadores moleculares de ¹¹¹In determinados em camundongos *BALB/c* machos sadios (n = 5). Os parâmetros foram calculados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00, após o ajuste para decaimento exponencial em duas fases e cálculo da área sob as curvas.

Parâmetro Farmacocinético	Marcador Molecular		
	YG₃-DTPA-¹¹¹In	YG₅-DTPA-¹¹¹In	YG₅N-DTPA-¹¹¹In
t_½ (α)¹ (min)	7,63	0,88	1,25
t_½ (β)² (min)	43,52	13,57	10,49
α³ (min⁻¹)	0,10	0,78	0,56
β⁴ (min⁻¹)	0,02	0,05	0,07
CL⁵ (mL.min⁻¹)	0,38	1,19	0,97
Vd⁶ (L.kg⁻¹)	0,76	0,95	0,55

¹Tempo de meia-vida da fase rápida ou distributiva; ²tempo de meia-vida da fase lenta ou de eliminação; ³contante de distribuição; ⁴constante de eliminação; ⁵depuração; ⁶volume de distribuição

O tempo de meia-vida plasmática da fase distributiva e a depuração dos marcadores moleculares confirmam o perfil de lipofilicidade dos derivados da bombesina previsto pelos valores de coeficiente de partição teórico e experimental e para os TR de CLAE. Compostos mais lipossolúveis apresentam meia-vida plasmática da fase distributiva mais longa e a depuração mais lenta^{100; 101}. Apesar da diferença discreta na lipofilicidade dos derivados, o marcador molecular YG₃-DTPA-¹¹¹In apresentou maior t_½ (α) e CL mais lenta, enquanto o YG₅-DTPA-¹¹¹In apresentou menor t_½ (α) e CL mais rápida.

6.4.6 Estudos de biodistribuição em camundongos *BALB/c* sadios

Os resultados dos estudos de biodistribuição do YG₃-DTPA-¹¹¹In, YG₅-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DTPA-¹¹¹In podem ser visualizados na TAB. 20. Pode-se observar uma

concentração significativa da radioatividade nos rins até 24 horas após a administração, indicando que os derivados são excretados principalmente por via renal. Deste modo, os rins provavelmente são os órgãos críticos para a dosimetria.

A excreção renal associada à baixa captação hepática de todos os derivados confirma a baixa lipofilicidade encontrada nos estudos de CLAE e coeficiente de partição teórico e experimental.

O pâncreas é um órgão que expressa os receptores BB₂ em alta densidade em camundongos e, portanto, é um controle da ligação dos derivados da bombesina a esses receptores, além de ser também responsável pelo acúmulo abdominal de muitos derivados estudados. Os marcadores moleculares apresentam menor captação pancreática em relação aos derivados da bombesina descritos na literatura^{20; 60; 99}, sendo a maior captação pancreática observada com o marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In. A baixa captação no pâncreas poderia sugerir ausência de captação tumoral, mas alguns estudos indicam que não há relação entre a captação pancreática ou intestinal e tumoral^{102; 17}.

TABELA 20 – Biodistribuição dos marcadores moleculares (1,85 MBq, 50 μ Ci, 0,01 nmol) em camundongos *BALB/c* machos sadios (n=5).

Órgão	Marcador molecular (% AI/g de tecido ou mL de sangue)								
	YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		
	1 hora	4 horas	24 horas	1 hora	4 horas	24 horas	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	0,83 $\pm$	0,20 $\pm$	0,05 $\pm$	0,12 $\pm$	0,03 $\pm$	0,01 $\pm$	0,08 $\pm$	0,04 $\pm$	0,01 $\pm$
	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Coração	0,28 $\pm$	0,08 $\pm$	0,05 $\pm$	0,06 $\pm$	0,02 $\pm$	0,01 $\pm$	0,05 $\pm$	0,02 $\pm$	0,01 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pulmões	0,47 $\pm$	0,12 $\pm$	0,08 $\pm$	0,11 $\pm$	0,04 $\pm$	0,02 $\pm$	0,12 $\pm$	0,17 $\pm$	0,03 $\pm$
	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
Pâncreas	0,19 $\pm$	0,05 $\pm$	0,04 $\pm$	0,05 $\pm$	0,02 $\pm$	0,01 $\pm$	1,86 $\pm$	0,92 $\pm$	0,72 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
Baço	0,21 $\pm$	0,12 $\pm$	0,11 $\pm$	0,06 $\pm$	0,04 $\pm$	0,03 $\pm$	0,08 $\pm$	0,05 $\pm$	0,05 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Estômago*	0,45 $\pm$	0,29 $\pm$	0,04 $\pm$	0,15 $\pm$	0,02 $\pm$	0,04 $\pm$	0,12 $\pm$	0,16 $\pm$	0,03 $\pm$
	0,2	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
Fígado	0,43 $\pm$	0,16 $\pm$	0,12 $\pm$	0,11 $\pm$	0,05 $\pm$	0,03 $\pm$	0,11 $\pm$	0,06 $\pm$	0,04 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rins	4,62 $\pm$	3,07 $\pm$	1,49 $\pm$	2,04 $\pm$	1,54 $\pm$	0,42 $\pm$	2,73 $\pm$	1,85 $\pm$	0,87 $\pm$
	0,6	0,4	0,3	0,3	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2
Intestinos*	0,40 $\pm$	0,86 $\pm$	0,09 $\pm$	0,20 $\pm$	0,13 $\pm$	0,07 $\pm$	0,52 $\pm$	0,47 $\pm$	0,08 $\pm$
	0,1	0,6	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
Músculo	0,22 $\pm$	0,06 $\pm$	0,03 $\pm$	0,03 $\pm$	0,01 $\pm$	0,01 $\pm$	0,01 $\pm$	0,01 $\pm$	0,01 $\pm$
	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Osso	0,48 $\pm$	0,13 $\pm$	0,08 $\pm$	0,05 $\pm$	0,02 $\pm$	0,02 $\pm$	0,02 $\pm$	0,02 $\pm$	0,02 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

* Com conteúdo.

6.4.7 Estudos de corpo inteiro em camundongos *BALB/c* sadios

Os fármacos inalterados ou seus metabólitos são excretados por diferentes vias, conforme suas propriedades físico-químicas. Compostos suficientemente polares ou hidrossolúveis são excretados predominantemente pelos rins⁹¹. De acordo com os estudos de coeficiente de partição, que mostraram baixa lipofilicidade dos marcadores moleculares, e com os estudos de biodistribuição, os quais mostraram alta captação renal, definiu-se a via renal como a principal via de excreção dos derivados da bombesina radiomarcados com índio-111.

A excreção de fármacos na urina é resultante de três processos renais: filtração glomerular, secreção tubular e reabsorção tubular. Na filtração glomerular, somente fármacos combinados às proteínas ou moléculas grandes são retidos no compartimento sanguíneo. As substâncias altamente lipossolúveis, após sofrerem filtração glomerular, são reabsorvidas por difusão passiva nos túbulos renais. Através dos rins, portanto, são eliminadas substâncias polares e suficientemente hidrossolúveis. A secreção tubular contribui igualmente na eliminação de fármacos do organismo⁹¹. Nesse caso, a secreção ocorre nos túbulos renais proximais e é mediada por transportadores¹⁰³. Os fármacos excretados por filtração glomerular e secreção tubular apresentam meia-vida biológica curta⁹¹.

A fim de prever o tempo de residência no organismo e a excreção dos marcadores moleculares derivados da bombesina, estudos de corpo inteiro foram realizados em camundongos *BALB/c* sadios. Os resultados, expressos em porcentagem da atividade injetada retida no organismo em função do tempo após a administração endovenosa são mostrados na FIG. 46. Pode-se observar, pelos dados mostrados, que o perfil de eliminação dos marcadores moleculares é semelhante, e que apenas uma pequena fração do total injetado ainda permanece retida no organismo 4 horas após a administração.

FIGURA 46 – Cinética de corpo inteiro dos marcadores moleculares em camundongos *BALB/c* (n = 5).

Os dados utilizados para construir as curvas da FIG. 46 foram ajustados para um modelo de decaimento exponencial utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.00 para cálculo da meia-vida biológica ($T_{1/2}$) e da constante de eliminação do organismo (K_{el}) e esses dados são apresentados na TAB. 21. Todos os marcadores moleculares apresentam meia-vida biológica curta e o marcador molecular que apresenta maior meia-vida biológica é o YG₅N-DTPA-¹¹¹In.

TABELA 21 – Parâmetros de corpo inteiro para os marcadores moleculares de ¹¹¹In determinados em camundongos *BALB/c* machos sadios (n = 5). Os parâmetros foram calculados utilizando o GraphPad Prism® 5.00, após o ajuste para decaimento exponencial em uma fase.

Parâmetro	Marcador molecular		
	YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In
$t_{1/2}$ (h)	0,31	0,38	1,27
K_{el} (h ⁻¹)	2,26	1,84	0,55

A tendência anteriormente mostrada para a lipofilicidade dos derivados pelos coeficientes de partição teóricos e experimentais e pelos TR de CLAE e confirmada nos estudos farmacocinéticos e de biodistribuição em camundongos sadios não foi observada nos estudos de corpo inteiro, nos quais o marcador molecular mais lipossolúvel apresentou menor tempo de residência no organismo e maior constante de eliminação. Isso provavelmente ocorre porque o tempo de residência de um fármaco no organismo não depende apenas de sua lipofilicidade, mas do conjunto de processos que determinam sua distribuição para os órgãos, interação com os receptores nas células alvo, metabolismo e excreção.

6.4.8 Estudos de biodistribuição em camundongos *Nude* com tumor PC-3

Para avaliar comparativamente a ligação dos marcadores moleculares às células de tumor de próstata *in vivo*, desenvolveu-se um modelo animal por meio da inoculação das células PC-3, derivadas de adenocarcinoma de próstata humano, por via subcutânea, no dorso dos camundongos *Nude*. O tumor de células PC-3 foi escolhido por superexpressar receptores BB₂⁸⁸, tendo sido amplamente descrito pela literatura em estudos envolvendo derivados da bombesina^{17; 18; 20}.

Os resultados da captação dos marcadores moleculares no tumor de células PC-3 e nos principais órgãos dos camundongos *Nude* encontram-se na TAB. 22. Pode-se observar, pelos resultados obtidos, que o marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In apresentou captação tumoral significativamente maior em todos os tempos estudados ($p < 0,05$). Esse marcador molecular foi também o que apresentou maior captação pancreática, resultado que sugere sua maior especificidade pelos receptores BB₂, conhecidamente superexpressos no pâncreas de camundongos⁸⁸.

TABELA 22 – Biodistribuição dos marcadores moleculares (1,85 MBq, 50 μ Ci, 0,01 nmol) em camundongos *Nude* implantados com adenocarcinoma de próstata humano por via subcutânea (n = 3).

Órgão	Marcador molecular (% AI/g de tecido ou mL de sangue)								
	YG ₃ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ -DTPA- ¹¹¹ In			YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		
	1 hora	4 horas	24 horas	1 hora	4 horas	24 horas	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	0,04 $\pm$	0,01 $\pm$	0,00 $\pm$	0,14 $\pm$	0,03 $\pm$	0,01 $\pm$	0,56 $\pm$	0,10 $\pm$	0,06 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0
Tumor	0,05 $\pm$	0,03 $\pm$	0,02 $\pm$	0,08 $\pm$	0,06 $\pm$	0,03 $\pm$	0,49 $\pm$	0,35 $\pm$	0,19 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
Pâncreas	0,02 $\pm$	0,01 $\pm$	0,01 $\pm$	0,03 $\pm$	0,04 $\pm$	0,01 $\pm$	3,41 $\pm$	3,26 $\pm$	1,07 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	1,4	0,1
Fígado	0,06 $\pm$	0,03 $\pm$	0,02 $\pm$	0,07 $\pm$	0,05 $\pm$	0,04 $\pm$	0,17 $\pm$	0,09 $\pm$	0,05 $\pm$
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rins	1,98 $\pm$	1,18 $\pm$	0,51 $\pm$	2,50 $\pm$	1,79 $\pm$	0,87 $\pm$	2,85 $\pm$	2,08 $\pm$	0,80 $\pm$
	0,2	0,3	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1
Intestinos*	0,11 $\pm$	0,10 $\pm$	0,10 $\pm$	0,08 $\pm$	0,12 $\pm$	0,21 $\pm$	0,84 $\pm$	0,45 $\pm$	0,30 $\pm$
	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0

* Com conteúdo.

A maior ligação do YG₅N-DTPA-¹¹¹In no tumor e no pâncreas é provavelmente resultado da sua maior estabilidade e do tempo de meia-vida plasmática curto, necessário para evitar sua completa degradação enzimática *in vivo*, mas suficiente para permitir sua ligação aos receptores BB₂.

Os estudos de biodistribuição em *Nude* com tumor PC-3 também confirmaram o rápido clareamento sanguíneo, a excreção renal e a baixa lipossolubidade dos marcadores moleculares, evidenciada por sua baixa captação hepática, previamente descritas nos camundongos *BALB/c* que receberam os mesmos marcadores moleculares por via endovenosa (TAB. 20).

6.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados e discussões apresentados anteriormente, pode-se concluir que:

- ✓ os marcadores moleculares foram obtidos com alta pureza radioquímica e alta atividade específica;
- ✓ os marcadores moleculares apresentam estabilidade frente à reação de marcação;
- ✓ os marcadores moleculares permanecem estáveis à temperatura ambiente na presença de agentes estabilizantes;
- ✓ os marcadores moleculares são compostos hidrofílicos e sofrem degradação tempo-dependente pelas enzimas do soro humano *in vitro*;
- ✓ os marcadores moleculares apresentam rápido clareamento sanguíneo e rápida eliminação do organismo;
- ✓ o marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In apresenta maior estabilidade em soro *in vitro*, maior tempo de residência no organismo e maior captação pancreática e tumoral *in vivo*, o que sugere a sua capacidade de reconhecer os receptores BB₂. É provavelmente, dentre os compostos estudados, o marcador molecular mais promissor para aplicações clínicas e foi o escolhido para realização dos demais estudos, descritos a seguir.

MARCADORES MOLECULARES PARA SPECT: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE QUELANTES BIFUNCIONAIS

Neste capítulo apresentam-se a revisão bibliográfica, os métodos, resultados e discussões relativos à segunda etapa do trabalho, que consistiu na avaliação comparativa do derivado da bombesina YG₅N conjugado ao quelante bifuncional DTPA ou DOTA e radiomarcado com índio-111, com ênfase no efeito do agente quelante sobre a capacidade de ligação do marcador molecular às células tumorais *in vitro* e *in vivo*, bem como sobre o seu comportamento biológico *in vivo* e a sua estabilidade *in vitro* e *in vivo*.

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- ✓ Radiomarcar o YG₅N-DOTA com ¹¹¹In com a mais alta atividade específica e compará-la com a atividade específica obtida para o YG₅N-DTPA;
- ✓ caracterizar a presença dos receptores BB₂ em diferentes linhagens tumorais humanas *in vitro*;
- ✓ estudar a influência do agente quelante sobre a ligação, internalização e externalização do marcador molecular por diferentes células tumorais que expressam receptores BB₂;

- ✓ avaliar o efeito do agente quelante sobre a estabilidade do marcador molecular em plasma de camundongo *in vitro* e *in vivo*;
- ✓ comparar a biodistribuição e a imagem de SPECT/CT do marcador molecular conjugado ao DTPA e ao DOTA;
- ✓ avaliar e comparar o potencial do marcador molecular conjugado ao DTPA e ao DOTA para aplicação *in vivo* por meio da comparação direta em estudos de biodistribuição, imagem e estabilidade no tumor e em tecidos com um derivado da bombesina descrito pela literatura;
- ✓ determinar o agente quelante mais adequado para conjugação ao YG₅N e aplicação *in vivo*.

7.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA

O ^{111}In é um metal do grupo IIIB cujo estado de oxidação mais prevalente em solução aquosa é +3. Devido à alta densidade de carga, o ^{111}In complexa com fortes doadores de elétrons, tais como o nitrogênio de grupos amina e o oxigênio de grupos carboxila. Sendo assim, derivados dos agentes quelantes DTPA, DOTA ou NOTA (1,4,7-tricarboximetil-1,4,7-triazaciclononano) (FIG. 47) podem utilizados para marcação de moléculas pequenas com ^{111}In , sendo os dois primeiros mais comumente utilizados¹⁰⁴.

FIGURA 47 – Exemplos de derivados do DTPA, DOTA e NOTA que podem ser utilizados para marcação de moléculas com ^{111}In ¹⁰⁴.

Considerando os derivados da bombesina, o agente quelante acíclico DTPA e o macrocíclico DOTA têm sido amplamente utilizados e permitem a radiomarkação com ^{111}In com alta atividade específica. Peptídeos conjugados ao DTPA são preferíveis para marcação com ^{111}In devido à possibilidade de marcação à temperatura ambiente e, usualmente, atividades específicas maiores do derivado radiomarcado são obtidas^{61; 82}. Por outro lado, peptídeos conjugados ao DOTA e radiomarcados com ^{111}In apresentam maior estabilidade *in vitro* and *in vivo*²¹. Independentemente do agente quelante utilizado, os pré-requisitos mais importantes para sua conjugação com moléculas para marcação com radiometais são: (I) estabilidade termodinâmica e ausência de interferência na biodistribuição em condições fisiológicas, a fim de minimizar a liberação e translocação do metal livre para órgãos não-alvo; (II) baixos níveis de localização em órgãos não-alvo e (III) para moléculas internalizadas após a ligação ao receptor, rápida eliminação dos catabólitos após a proteólise¹⁰⁵. Apesar do grande número de derivados da bombesina radiomarcados descritos até o presente, há pouca informação acerca do agente quelante mais adequado, considerando não apenas os parâmetros de radiomarkação, mas também a estabilidade e propriedades *in vitro* e *in vivo*. Apenas dois trabalhos publicados até o presente trazem uma comparação direta entre quelantes conjugados a derivados da bombesina, ou seja, comparam o mesmo derivado da bombesina conjugado a diferentes agentes quelantes por diferentes metodologias *in vitro* e *in vivo*.

Um derivado da bombesina – $[\epsilon\text{-Lys}^3, \text{Tyr}^4]\text{-BBN}$ – conjugado ao DTPA e ao DOTA e radiomarcado com ^{111}In foi avaliado quanto à ligação e internalização por células AR42-J de tumor de pâncreas de rato e biodistribuição em ratos. A máxima atividade específica obtida para o derivado conjugado ao DTPA (270 GBq/ μmol) foi maior do que para o derivado conjugado ao DOTA (30 GBq/ μmol). Nos estudos *in vitro*, não foram observadas diferenças significativas entre peptídeo conjugado ao DTPA e ao DOTA na ligação e internalização pelas células AR42-J. Nos estudos de biodistribuição em ratos sadios, o derivado conjugado ao DOTA apresentou maior ligação aos tecidos que superexpressam os receptores BB_2 . Apesar desse resultado favorável à utilização $[\epsilon\text{-Lys}^3, \text{Tyr}^4]\text{-BBN-DOTA}$, os autores escolheram o derivado conjugado ao DTPA para iniciar estudos clínicos de fase I, devido à maior facilidade de radiomarkação.

Zhang e colaboradores avaliaram os derivados da bombesina BZH1 (GABA-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Thi¹³; Nle¹⁴]-BBN(6-14)-DTPA) e BZH2 (GABA-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Thi¹³; Nle¹⁴]-BBN(6-14)-DOTA), com afinidade pelos três receptores, e radiomarcados com índio-111, lutécio-177 e ítrio-90 quanto à ligação às células AR42-J e PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano *in vitro* e *in vivo*. As marcações do BZH1 com ¹¹¹In ocorreram a temperatura ambiente por uma hora e as do BZH2 a 95 °C por 25 minutos e todas as reações apresentaram alto rendimento e atividades específicas maiores que 37 GBq/μmol das moléculas radiomarcadas para os dois agentes quelantes utilizados. Nos estudos de estabilidade em soro humano *in vitro*, produtos de clivagem dos dois derivados foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nos estudos com células *in vitro*, ambos os peptídeos foram internalizados pelas células AR42-J e PC-3 em taxas similares. Entretanto, os estudos de externalização em células AR42-J demonstraram maior taxa de externalização para o BZH1. Em contrapartida, nos estudos de biodistribuição *in vivo* em modelo animal de tumor de células AR42-J, esse derivado foi também o que apresentou maior captação tumoral. Os autores concluíram que ambos os derivados são ferramentas promissoras para o diagnóstico de tumores que expressam quaisquer receptores para a bombesina, não havendo diferenças que favoreçam a utilização do DTPA ou do DOTA como agente quelante²¹.

À medida que novos peptídeos radiomarcados surgem como novas ferramentas para diagnóstico e terapia, os agentes quelantes se tornam cada vez mais importantes em radioquímica. Ainda que o ligante seja o responsável pela biodistribuição da molécula radiomarcada, o agente quelante pode influenciar diretamente a sua estabilidade e comportamento *in vivo*. Em decorrência do pequeno número de trabalhos comparativos publicados e dos resultados conflitantes obtidos, faz-se necessário avaliar, para um derivado da bombesina específico, o melhor agente quelante para conjugação e marcação com ¹¹¹In, não apenas do ponto de vista de praticidade do procedimento de radiomarcagem, mas também quanto à estabilidade, ligação às células alvo *in vitro* e *in vivo*, bem como perfil de biodistribuição do marcador molecular obtido.

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

7.3.1 Infraestrutura

Os ensaios compreendidos nesta etapa do trabalho foram realizados no Cancer Imaging Laboratory do Centre for Molecular Oncology, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, localizado em Londres, Reino Unido. O laboratório forneceu toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, cultivo de células e experimentos com animais.

7.3.2 Materiais

7.3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ ácido 2-(*N*-morflino)ethanosulfônico (MES) (Sigma-Aldrich Co, EUA);
- ✓ acetato de amônio (Sigma-Aldrich Co, EUA);
- ✓ azida sódica (Sigma-Aldrich Co, EUA);
- ✓ ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma-Aldrich Co, EUA);
- ✓ soroalbumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Co, EUA);
- ✓ ácido trifluoroacético (TFA) (Fluka, EUA);
- ✓ meio de cultura RPMI 1640 (PAA, Austria);
- ✓ meio de cultura DMEM(PAA, Austria);
- ✓ tripsina-EDTA (PAA, Austria);
- ✓ soro fetal bovino (SFB) (PAA, Austria);
- ✓ acetonitrila (Fisher Scientific, Reino Unido);
- ✓ ácido acético (Fisher Scientific, Reino Unido);
- ✓ hidróxido de sódio (Fisher Scientific, Reino Unido);
- ✓ ácido hidroxietil-piperazinaetanosulfônico (HEPES) (BDH Biochemical, Reino Unido);
- ✓ kit para dosagem de proteínas (BioRad, Reino Unido);
- ✓ tetrametiletlenodiamina (TEMED) (Thermo Scientific, EUA);
- ✓ reagentes para Western Blot (National Diagnosis, Reino Unido);
- ✓ reagente quimioluminescente (ECL) (GE Healthcare, Reino Unido);

- ✓ anticorpo policlonal anti-BB₂ derivado de coelho (abcam, Reino Unido);
- ✓ anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho (Dako, Dinamarca);
- ✓ derivado da bombesina BZH3 (cedido pelo Dr. Helmut Mäecke, Hospital Universitário de Basel, Suíça);
- ✓ tabletes inibidores de protease (Roche Alemanha);
- ✓ Tris-Base-NaCl (TBS) (Medicago, Suécia);
- ✓ isoflurano (Merck, Alemanha);
- ✓ cloreto de índio não radioativo (Merck, Alemanha);
- ✓ ¹¹¹InCl₃ em 0.05 M HCl (Covidien, Países Baixos).

Os reagentes utilizados e não listados acima são de mesma origem dos reagentes listados no capítulo 6, seção 6.3.2.1.

7.3.2.2 Equipamentos, materiais e sistemas

Os equipamentos, materiais e sistemas utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ Agitador de tubos (Stuart, Reino Unido);
- ✓ balança analítica (Sartorius, Reino Unido);
- ✓ balança de precisão PF-3202 (Fisherbrand; Reino Unido);
- ✓ centrífuga Allegra TM 21 R (Beckman counter, Alemanha);
- ✓ coluna de fase reversa C₁₈ para cromatografia líquida de alta eficiência (Jupiter 300; 4,6 x 250 mm, 5 µm – Phenomenex, EUA);
- ✓ contador gama C1282 (LKBWallac, EUA);
- ✓ espectrofotômetro DU 650 (Beckman, Alemanha);
- ✓ estufa de CO₂ (Binder, EUA);
- ✓ fluxo laminar classe 2 (Scanlaf, EUA);
- ✓ freezer – 80 °C (Science Temp, Reino Unido);
- ✓ leitor de microplacas DTX 880 (Beckman counter, Alemanha);
- ✓ medidor de pH (Sartorius, Reino Unido);
- ✓ sistema de transferência de gel para em PVDF iBlot System (Invitrogen, Israel);
- ✓ masserador Ultra-Turrax T8 (IkaLabortechnik, Alemanha);

- ✓ cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por sistema modulado constituído por bomba 126 e detector UV 168 (Beckman, Alemanha);
- ✓ detector radioativo GABI (câmara de cintilação – NaI) do sistema CLAE (Raytest, EUA);
- ✓ contador automático de células (Beckman, Alemanha);
- ✓ evaporador a vácuo Speed Vac Plus SC110A (Savant, Reino Unido);
- ✓ filmes fotográficos (Kodak, Japão);
- ✓ Nano-SPECT/CT (Bioscan Inc., EUA);
- ✓ processador de filmes Curix 60 (AGFA, Reino Unido);
- ✓ suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada ITLC-SG (Varian, Canadá);
- ✓ pipetas sorológicas de 5, 10 e 25 mL (Costar, EUA);
- ✓ espátula para remoção de células (BD Falcon, Bélgica);
- ✓ placas de cultura de seis poços (Costar, EUA).

Os equipamentos, materiais e sistemas utilizados e não listados acima são de mesma origem dos listados no capítulo 6, seção 6.3.2.2.

7.3.2.3 Tampões e soluções

Os principais tampões e soluções utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ solução de EDTA 50 mM em acetato de amônio 0,1 M pH 5,5;
- ✓ solução de PBS / 1 % BSA;
- ✓ solução de acetato de sódio 20 mM em Hanks Buffered Saline Solution (HBSS) pH 5,0;
- ✓ tampão tris 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, EDTA 1 μ M pH 8, Np40 0,5 % e glicerol 10 % (tampão de lise);
- ✓ BSA 3 % em TBS (tampão tris-salina) contendo 0,01 % de Tween 20 (TBST);
- ✓ tampão acetato de amônio 1 M pH 5,5;
- ✓ tampão MES 1 M pH 5,5.

Os tampões e soluções utilizados e não listados acima foram listados anteriormente no capítulo 6, seção 6.3.2.3.

7.3.2.4 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos *BALB/c*, *SCID* ou *beige SCID* machos, de seis semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso (Charles River Laboratories, Reino Unido). Todos os experimentos foram realizados em uma instalação Classe-2 de confinamento e de acordo com as diretrizes da Comissão Consultiva para a utilização de agentes patogênicos (Advisory Committee for Dangerous Pathogens) e conforme os regulamentos do Ministério do Interior do Reino Unido (British Home Office) para experimentação animal.

7.3.3 Métodos

7.3.3.1 Metodologias analíticas

A) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Aplicou-se uma alíquota da mistura de radiomarcagem sobre as fitas de sílica gel (1,0 x 7,5 cm) e procedeu-se à cromatografia utilizando como fase móvel solução de EDTA 50 mM em acetato de amônio 0,1 M pH 5,5. Nesse sistema, o marcador molecular permanece na origem da fita (R_f 0,0 – 0,1), enquanto o $^{111}\text{InCl}_3$ migra com R_f 1,0.

B) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação da pureza radioquímica das marcações e as análises de estabilidade foram realizados em um sistema Beckman equipado com bomba System Gold 128 e um detector UV 166 e combinado a um detector de radiação GABi Star (Raytest, GmbH). Os compostos foram separados por uma coluna de fase reversa C18 Jupiter 300 (4,5 x 250 mm, 5 μm ; Phenomenex) através do seguinte sistema de solventes: solvente A, 0,1 % de TFA em água; solvente B, 0,1 % de TFA em acetonitrila; gradiente 0 % de B por 2 min, 0 a 60 % de B por 20 min, seguido de 100% de B por 5 min e retornando ao estado inicial por 5 min (fluxo de 1 mL/min).

7.3.3.2 Radiomarcagem do peptídeo conjugado ao DTPA e ao DOTA com ^{111}In

O derivado da bombesina conjugado ao DTPA foi radiomarcado com ^{111}In com a máxima atividade específica descrita no capítulo anterior, mas utilizando um outro

protocolo, tendo em vista a diferença de pureza, concentração e origem entre os reagentes constantes nos laboratórios em que a etapa anterior foi realizada e em que essa etapa foi realizada. Adicionou-se 5 µL de tampão acetato de amônio 1 M pH 5,5 e 0,2 µg do peptídeo em 5 µL de tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 a 18 MBq (0,5 mCi; 20 µL) de $^{111}\text{InCl}_3$ em HCl 0,05 M. A solução foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. O pH foi mantido em 5,5.

Para a radiomarcagem do derivado da bombesina conjugado ao DOTA, estudos preliminares foram realizados a fim de determinar a massa de peptídeo que conferia maior atividade específica ao marcador molecular. Resumidamente, adicionou-se 5 µL de tampão MES 1 M pH 5,5 e 0,3 µg do peptídeo em 5 µL de tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 a 18 MBq (0,5 mCi; 20 µL) de $^{111}\text{InCl}_3$ em HCl 0,05 M. A solução foi aquecida a 93 °C por 15 minutos. O pH foi mantido em 5,5.

Ao final das reações, determinou-se a pureza radioquímica por CCD e CLAE, conforme descrito anteriormente na seção 7.3.3.1. Todos os reagentes utilizados nas reações foram preparados com água purificada por equipamento de osmose reversa e tratada com resina Chelex 100 para remoção de íons metálicos.

7.3.3.3 Cultivo celular

As células de adenocarcinoma prostático humano grau IV androgênio independente (PC-3) e de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231) (Cancer Research Cell Services, Reino Unido) foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB. As células de carcinoma prostático humano androgênio dependente (LNCaP), carcinoma ductal primário de mama humano (BT-474) e carcinoma ductal metastático humano (T-47D) (Cancer Research Cell Services, Reino Unido) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 4 mM de L-glutamina e 10 % de SFB. As células foram mantidas em ar humidificado contendo 5 % de CO_2 a 37 °C. As células foram cultivadas até 80 % de confluência, tripsinizadas e ressuspensas de acordo com cada experimento.

7.3.3.4 Estudos *in vitro*

A) *Western blot*

A expressão dos receptores BB₂ pelas células PC-3 e LNCaP de câncer de próstata humano e BT-474, MDA-MB-231 e T-47D de câncer de mama humano foi investigada por Western blot. As células foram cultivadas em placas de 10 cm até a formação de uma monocamada e foram então lavadas com PBS, removidas para 1 mL de PBS e centrifugadas a 1000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram lisadas com 200 µL de tampão de lise. O lisado foi mantido em gelo por 20 minutos e centrifugado a 10000 *g* por 10 minutos. A concentração de proteína nas amostras foi determinada utilizando o conjunto de reagentes para determinação de proteínas por método colorimétrico (Biorad).

As proteínas celulares foram fracionadas utilizando um gel de poliacrilamida 10 %, que foi transferido para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência Invitrogen®. A membrana foi incubada por 24 horas a 4 °C com 10 mL de uma solução de anticorpo anti-BB₂ de coelho (1 µg/mL), lavada três vezes por 10 minutos com TBST, seguido da adição do anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase e incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a membrana foi novamente lavada três vezes por 10 minutos com TBST e exposta ao reagente de detecção por quimioluminescência e a um filme Kodak XAR por 30 segundos. Após a revelação do filme, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 10 minutos com TBST e incubada por 24 horas a 4 °C com 10 mL de uma solução de anticorpo anti-tubulina 1 µg/ml, seguido de três lavagens com TBST, adição do do anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase e incubação por 1 hora, a fim de determinar qualitativamente a quantidade de proteína em cada amostra. Após três lavagens de 10 minutos com TBST, adicionou-se o reagente de detecção por quimioluminescência e expôs-se o conjunto a um filme Kodak XAR. A intensidade das bandas do receptor BB₂ e de tubulina foram comparadas qualitativamente para a determinação da intensidade de expressão dos receptores BB₂ pelas cinco linhagens celulares. O experimento foi realizado em triplicata.

B) *Ensaios de ligação específica*

Os ensaios de ligação específica foram realizados com o marcador molecular

YG₅N-DOTA-¹¹¹In nas células PC-3, LNCaP de tumor de próstata e BT-474, MDA-MB-231 and T-47D de tumor de mama. O marcador molecular (100 GBq/μmol) foi diluído em meio de cultura contendo 1 % de SFB (v/v) a uma concentração radioativa de 4×10^5 cpm/mL. O peptídeo não radiomarcado (10 μM em meio de cultura contendo 1 % de SFB v/v) foi utilizado como competidor. O ensaio foi realizado por meio da adição de diferentes quantidades de células (0,125, 0,25, 0,5 e $1,0 \times 10^6$ células em 0,5 mL de meio de cultura contendo 1 % v/v SFB) a tubos cônicos de 1,5 mL, seguido da adição de 250 μL de meio de cultura (1 % SFB) (ligação total) ou 250 μL da solução do competidor (ligação não-específica) e 250 μL da solução contendo o marcador molecular diluído. Os tubos foram incubados a 20 °C por 1,5 h, centrifugados a 5000 g por 5 minutos, lavados duas vezes com 1 mL de PBS/1 % BSA e contados em contador gama. As curvas de porcentagem de ligação total, ligação específica e não-específica em relação ao número de células foram construídas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®]. O experimento foi realizado em triplicata.

C) Ensaios de saturação

Os ensaios de saturação com os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In foram realizados em células PC-3, LNCaP e T-47D aderentes, semeadas em placas de seis poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e mantidas a 37 °C por 24 h em estufa com ar humidificado contendo 5 % de CO₂. Os derivados da bombesina (3×10^{-9} mol) foram radiomarcados com 4 MBq de ¹¹¹In e, ao final da reação, um excesso de duas vezes do isótopo estável (InCl₃) foi adicionado à mistura, e deixou-se reagir por mais 5 min. Os marcadores moleculares foram diluídos para 1 mL de PBS (concentração final 4 μM) e diluições seriadas de 400 a 1 nM foram realizadas em PBS/1 % BSA. Os derivados não radiomarcados conjugados ao DTPA ou DOTA (10 μM em PBS/1 % BSA) foram utilizados como competidores.

O ensaio foi realizado da seguinte forma: o meio de cultura das células foi removido e as células foram lavadas com 1 mL de meio de cultura (1 % SFB). Adicionou-se, a cada poço, 1,2 mL de meio de cultura contendo 1 % v/v de SFB e 0,1% (p/v) de azida sódica, 150 μL de BSA 1 % PBS p/v (ligação total) ou 150 μL do competidor (ligação específica) em triplicata e 150 μL das concentrações crescentes do marcador molecular

em triplicata (concentração final 0,1 – 40 nM). Cada concentração do marcador molecular (150 µL) foi também adicionada a tubos de contagem para medida do total de atividade correspondente a cada concentração. As placas foram incubadas a 20 °C por 1,5 h e, decorrido o tempo, removeu-se o meio de incubação, lavou-se as células duas vezes com 1 mL meio de cultura contendo 1 % v/v de SFB e 0,1 % (p/v) de azida sódica e 1 mL de NaOH 1 M foi adicionado a cada poço. O conteúdo dos poços foi removido para tubos de contagem após 15 minutos, juntamente com duas lavagens com 1 mL de PBS, e contados no contador gama. Além disso, a concentração de proteína foi determinada em três poços utilizando um conjunto de reagentes para determinação de proteínas por método colorimétrico (Biorad). A constante de dissociação (K_d) e o número máximo de receptores para cada marcador molecular em cada célula (B_{max}) foram calculados por regressão não linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®]. Os experimentos foram realizados em triplicata.

D) Internalização e efluxo

Células PC-3 semeadas em placas de seis poços ($2,5 \times 10^5$ /poço) e mantidas a 37 °C e 5 % CO₂ por 48 horas foram utilizadas nesses ensaios. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização (DMEM 1 % v/v SFB). Adicionou-se 1 mL de meio de internalização a cada poço, seguido da adição, em triplicata, de 150 µL de YG₅N-DTPA-¹¹¹In ou YG₅N-DOTA-¹¹¹In (100 GBq/µmol) em 1 % (p/v) BSA/PBS e 150 µL de 1 % (p/v) BSA/PBS (ligação total) ou 150 µL de competidor (YG₅N-DTPA ou YG₅N-DOTA 10 µM) em 1 % (p/v) BSA/PBS (ligação não-específica). As células foram incubadas a 37 °C e 5 % CO₂ por 10, 30, 60, 120 ou 180 minutos. Ao final de cada tempo, as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização, tratadas com 1 mL de acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em HBSS por 10 minutos, seguido de uma lavagem rápida com a mesma solução. As lavagens ácidas foram coletadas para tubos de contagem para avaliação do total ligado à membrana celular. Para análise da internalização, as células foram lisadas com 1 mL de NaOH 1 M e o conteúdo foi removido para tubos de contagem após 15 minutos, juntamente com duas lavagens com 1 mL de PBS. Além disso, a concentração de proteína foi determinada em três poços utilizando um conjunto de reagentes para determinação de proteínas por método colorimétrico

(Biorad). Após a contagem dos tubos em contador gama, a porcentagem de internalização específica foi calculada em função do total de radioatividade na célula (ligada + internalizada) e do total de radioatividade adicionado.

Para análise do efluxo, o ensaio de internalização foi realizado por 60 minutos conforme descrito anteriormente, seguido das duas lavagens ácidas para remoção dos marcadores moleculares ligados à membrana. As células foram então reincubadas com 1,5 mL de meio de internalização a 37 °C e 5 % CO₂ por 10, 30, 60 ou 120 minutos. Decorrido o tempo, o meio de cultura foi transferido para tubos de contagem, juntamente com duas lavagens com 1 mL de PBS (fração externalizada), as células foram lisadas com 1 mL de NaOH 1 M e o conteúdo foi removido para tubos de contagem após 15 minutos, juntamente com duas lavagens com 1 mL de PBS (fração internalizada). Após a contagem dos tubos em contador gama, a porcentagem externalizada foi calculada em função do total de radioatividade internalizada em cada tempo.

E) Análise da estabilidade em plasma de camundongo “in vitro”

Para obtenção do plasma de camundongo, camundongos *BALB/c* foram anestesiados com isoflurano 2 % e oxigênio 0,5 L/min e coletou-se o sangue por punção cardíaca para um tubo contendo o anticoagulante EDTA, centrifugou-se a 1400 *g* por 10 minutos e separou-se o plasma.

Adicionou-se, em duplicata, 5 MBq de cada marcador molecular a 1 mL de plasma de camundongo e incubou-se a 37 °C sob agitação por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas. Decorrido o tempo, retirou-se uma alíquota das misturas (200 µL), adicionou-se etanol (1:1 v/v) para precipitação das proteínas e centrifugou-se a 10000 *g* (11000 rpm). Coletou-se uma alíquota do sobrenadante e o precipitado e a radioatividade foi determinada no contador gama. A porcentagem dos marcadores moleculares ligados às proteínas plasmáticas (LP) foi determinada pela equação 1 (EQ. 1). O restante do sobrenadante foi parcialmente evaporado em evaporador à vácuo, diluído em PBS, filtrado em membrana 0,22 µm e analisado por CLAE, conforme descrito na seção 6.3.3.1 (método B).

7.3.3.5 Estudos *in vivo*

A) Estudo de saturação e competição “*in vivo*” em camundongos com tumor de células PC-3

A fim de avaliar se os receptores nas células tumorais são saturáveis e se a ligação dos marcadores moleculares a essas células *in vivo* é específica, realizou-se um estudo de saturação e competição com o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In em camundongos *SCIDs* injetados com 4×10^6 células PC-3 por via subcutânea no flanco esquerdo. Os animais foram utilizados 15 a 21 dias após a administração, quando os tumores atingiram cerca de 5 mm de diâmetro.

Os animais foram divididos em três grupos. No primeiro, injetou-se 0,03 nmol do marcador molecular (2 MBq, 50 μ Ci; diluídos em 200 μ L de solução PBS); no segundo injetou-se 0,3 nmol do marcador molecular (20 MBq, 500 μ Ci; diluído em 200 μ L de solução PBS) e no terceiro injetou-se 25 nmol do peptídeo não radiomarcado e 0,03 nmol do marcador molecular (2 MBq, 50 μ Ci; diluídos em 200 μ L de solução PBS). Após 4 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano 2 % e oxigênio 0,5 L/min, sacrificados por deslocamento cervical, os principais órgãos foram retirados, lavados e pesados, e avaliou-se a radioatividade em cada um deles no contador gama. Calcularam-se as porcentagens da atividade por grama de tecido (% AI/g, EQ. 6) utilizando-se a média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada e as atividades no tumor e nos órgãos receptor-específicos foram comparadas entre os grupos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

B) Estudos de imagem, quantificação por imagem e biodistribuição em camundongos com tumor de células PC-3 ou LNCaP

A fim de comparar diretamente os marcadores moleculares com um derivado da bombesina amplamente descrito pela literatura, esses experimentos foram também realizados com BZH3-¹¹¹In¹⁴. Os objetos de estudo foram camundongos *beige SCIDs* ou *SCIDs* injetados com 4×10^6 células PC-3 ou 5×10^6 células LNCaP por via subcutânea no flanco esquerdo. Os animais foram utilizados 15 a 21 dias após a administração, quando os tumores atingiram cerca de 5 mm de diâmetro.

Os marcadores moleculares e o BZH3-¹¹¹In (13 MBq, 350 μ Ci, 0,13 nmol,

diluídos em 200 µL de solução PBS) foram administrados por via endovenosa caudal. Após 1 ou 4 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano 2 % e oxigênio 0,5 L/min e as imagens foram adquiridas em uma câmara de tomografia computadorizada por emissão de fóton único / tomografia computadorizada (NanoSPECT/CT). As imagens de SPECT de corpo inteiro foram obtidas em 24 projeções ao longo de 40 minutos através de um detector de quatro cabeças com pinholes de abertura 4 x 9 (2 mm) em modo de escaneamento helicoidal; as imagens de CT foram obtidas através de um raio X de 45-kVP em 180 projeções de 6 minutos. As imagens obtidas foram reconstruídas e analisadas utilizando o programa InVivoScope (Bioscan software). A captação no tumor e no músculo foi determinada utilizando o CT como referência e a porcentagem de atividade injetada por grama de tumor, bem como a relação tumor:músculo foram calculadas considerando o peso desses tecidos após a dissecação. Todas as atividades foram corrigidas pelo decaimento.

Após a aquisição das imagens de 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os principais órgãos foram retirados, lavados e pesados, e avaliou-se a radioatividade em cada um deles no contador gama. Calcularam-se as porcentagens da atividade por grama de tecido (% AI/g, EQ. 6, seção 6.3.3.7) utilizando-se a média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

C) Estudos de estabilidade “in vivo”

A análise da estabilidade dos marcadores moleculares *in vivo* foi realizada em plasma e tecidos.

A estabilidade em plasma foi realizada em camundongos *BALB/c*, os quais receberam 1 nmol (20 MBq, 540 µCi) de YG₅N-DTPA-¹¹¹In ou YG₅N-DOTA-¹¹¹In por via endovenosa. Após 5 ou 15 minutos, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 2 % e oxigênio 0,5 L/min e o sangue foi coletado por punção cardíaca para um tubo contendo EDTA. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3000 *g*, a 4 °C e o plasma foi separado. Adicionou-se etanol (1:1 v/v) ao plasma para precipitação das proteínas e centrifugou-se a 10000 *g* (11000 rpm). Coletou-se uma alíquota do sobrenadante e o precipitado e a radioatividade foi determinada no contador gama. A porcentagem dos

marcadores moleculares ligados às proteínas plasmáticas (LP) *in vivo* foi determinada pela equação 1 (EQ. 1, seção 6.3.3.4). O restante do sobrenadante foi parcialmente evaporado em evaporador à vácuo, diluído em PBS, filtrado em membrana 0,22 μm e analisado por CLAE, conforme descrito na seção 7.3.3.1.

Os estudos de estabilidade *in vivo* em tecidos de camundongo foram realizados conforme descrito por Ocak e colaboradores¹⁰⁶. Resumidamente, os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In, YG₅N-DOTA-¹¹¹In e o BZH3-¹¹¹In (13-15 MBq, 350 μCi , 0,13 nmol, 0,2 mL of PBS) foram administrados por via endovenosa caudal em camundongos *beige SCIDs* com tumor de células PC-3. Uma hora após a administração, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 2 % e oxigênio 0,5 L/min e sacrificados por deslocamento cervical. O tumor, o pâncreas e os rins foram removidos e acondicionados em 0,5 mL de HEPES 20 mM pH 7,3, mantidos em gelo e masserados em um masserador Ultra-Turrax T 8 por 5 minutos. As proteínas das amostras foram precipitadas com acetonitrila (1:1 v/v), homogeneizadas e centrifugadas a 10000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 1,5 mL, recentrifugado, evaporado à metade do volume, diluído em PBS e avaliado por CLAE, conforme descrito na seção 7.3.3.1. Os experimentos foram realizados em duplicata.

7.3.3.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores individuais quando $n = 2$ ou como Média $\pm$ Erro Padrão (ensaios *in vitro*) e Média $\pm$ Desvio Padrão (ensaios *in vivo*) quando $n \geq 3$. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando o teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação de pares e análise de variância ANOVA para comparação de grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.4.1 Radiomarcção do peptídeo conjugado ao DTPA e ao DOTA com ^{111}In

Ambos os peptídeos foram radiomarcados com ^{111}In com alta pureza radioquímica ($97,3 \pm 1,8$ % para $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ e $97,8 \pm 2,1$ % para $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$; $n = 5$) utilizando os protocolos descritos. A máxima atividade específica obtida foi 174 GBq/ μmol para o marcador molecular $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ e 100 GBq/ μmol para o marcador molecular $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$. Atividades específicas mais altas para derivados da bombesina conjugados ao DTPA e radiomarcados com ^{111}In já foram previamente descritas²¹. Para utilização nos demais experimentos, a atividade específica dos marcadores moleculares foi normalizada, a fim de evitar sua influência sobre a interação com os receptores e permitir uma comparação direta entre os quelantes DTPA e DOTA.

A FIG. 48 ilustra o perfil de CLAE dos dois marcadores moleculares, utilizando o sistema descrito na seção 7.3.3.1. Nesse sistema, o $^{111}\text{InCl}_3$ apresenta TR de $3,46 \pm 0,1$ minutos, enquanto os marcadores moleculares $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ e $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$ apresentam TR de $17,79 \pm 0,1$ e $17,83 \pm 0,1$ minutos, respectivamente.

FIGURA 48 – Perfil de CLAE representativo (radioativo; coluna C_{18} 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) dos marcadores moleculares YG_5N -DTPA- ^{111}In (174 GBq/ μ mol, A) e YG_5N -DOTA- ^{111}In (100 GBq/ μ mol, B). Os tempos de retenção do YG_5N -DTPA- ^{111}In e do YG_5N -DOTA- ^{111}In nesse sistema foram $17,79 \pm 0,1$ e $17,84 \pm 0,1$ minutos, respectivamente.

7.4.2 Estudos *in vitro*

7.4.2.1 Western Blot

Os resultados de Western blot obtidos para a banda de 50 KDa, correspondente ao receptor BB_2 , podem ser visualizados na FIG. 49. Todas as linhagens celulares estudadas expressam, em maior ou menor grau, o receptor BB_2 , mas as células

de tumor de mama BT-474 e T-47D expressam o receptor em menor quantidade. Apesar de as células MDA-MB-231 aparentarem expressar o receptor com a mesma intensidade do que as células LNCaP, elas apresentam uma menor quantidade deles, visto que o Western Blot para tubulina evidenciou uma maior concentração de proteínas na amostra dessas células. Sendo assim, a ordem decrescente de intensidade de expressão de receptores é PC-3, LNCaP, MDA-MB-231, BT-474 e T-47D.

FIGURA 49 – Western blot para BB₂, demonstrando que todas as linhagens celulares analisadas expressam o receptor. O resultado é representativo de três experimentos.

7.4.2.2 Ensaios de ligação específica

Tendo em vista que todas as células analisadas por Western blot demonstraram a expressão dos receptores BB₂, ensaios de ligação específica foram realizados com YG₅N-DOTA-¹¹¹In, a fim de determinar se os marcadores moleculares em estudo são capazes de se ligar a esses receptores e os resultados são apresentados na FIG. 50. Pode-se observar que o aumento no número de células promove um aumento na ligação total e na ligação específica do marcador molecular às células PC-3, LNCaP e T-47D, confirmando dados previamente publicados que indicam que derivados da bombesina são capazes de se ligar aos receptores BB₂ presentes nessas células^{9; 107}. Entretanto, apesar da ligação do ligante universal da bombesina às células BT-474 ter sido anteriormente demonstrada, o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In não foi capaz de se ligar a essa linhagem celular¹⁰⁷. Isso provavelmente se deve às diferenças de origem, forma de cultivo e manutenção das células, as quais podem provocar alterações na expressão de receptores por parte das células.

FIGURA 50 – Ligação do marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In às células de tumor de próstata (PC-3 e LNCaP) e mama (BT-474, MDA-MB-231 e T-47D) humanos. O aumento na ligação total e específica com o aumento no número de células sugere ligação ao receptor (n = 3).

Diferenças significativas quanto à expressão dos receptores por parte das células de tumor de mama podem ser observadas quando os resultados de Western blot e ligação específica são comparados. As células BT-474, MDA-MB-231 e T-47D demonstraram a presença de receptores no Western blot, mas o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In foi capaz de se ligar especificamente apenas à última. Esses resultados discrepantes podem decorrer da diferença entre a forma de ligação do anticorpo e do peptídeo ao receptor. Anticorpos geralmente se ligam a uma grande parte do receptor, a qual pode ou não ser correspondente ao sítio de ligação do peptídeo. Além disso, a porção do receptor que se liga ao peptídeo pode não estar externalizada nas células BT-474 e MDA-MB-231, o que impede a ligação¹⁰⁸.

7.4.2.3 Ensaios de saturação

As células às quais o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In foi capaz de se ligar especificamente foram submetidas a ensaios de saturação com os marcadores

moleculares $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ e $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$, a fim de avaliar o efeito do agente quelante sobre a afinidade do marcador molecular pelo receptor. As curvas representativas da saturação da ligação dos marcadores moleculares às células são apresentadas na FIG. 51.

FIGURA 51 – Curvas representativas da saturação da ligação dos marcadores moleculares $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ (esquerda) e $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$ (direita) às células LNCaP, PC-3 e T-47D. Dado: rec/cel = receptores por célula.

A afinidade (K_d) dos marcadores moleculares pelos receptores presentes nas células, bem como o número deles em cada uma das linhagens celulares ($B_{\max}$) encontram-se na TAB. 23. Pode-se observar que o marcador molecular $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$ se ligou mais (maior $B_{\max}$) às células PC-3 e LNCaP do que o $\text{YG}_5\text{N-DTPA-}^{111}\text{In}$ ($p < 0,05$),

mas a ligação de ambos às células T-47D foi semelhante. O número de receptores presente nas células PC-3 foi duas vezes maior do que nas LNCaP e cerca de dez vezes maior do que nas T-47D. Além disso, os marcadores moleculares apresentaram alta afinidade pelos receptores presentes nas células, (menor K_d), a qual foi maior para PC-3 e LNCaP do que para a T-47D ($p < 0,05$). Entretanto, apesar da afinidade semelhante, YG_5N -DOTA- ^{111}In se ligou duas vezes mais do que YG_5N -DTPA- ^{111}In a todas as células.

TABELA 23 – Parâmetros de ligação dos marcadores moleculares às células LNCaP, PC-3 e T-47D após ajuste das curvas de saturação por regressão não-linear ($n = 3$).

YG_5N-DTPA-^{111}In			
Linhagem Celular	LNCaP	PC-3	T-47D
B_{max} (fmol/mg)	$140,60 \pm 5,0$	$355,10 \pm 13,0$	$70,78 \pm 11,9$
B_{max} (rec/cel)	$(1,55 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,22 \pm 0,7) \times 10^5$	$(3,64 \pm 0,4) \times 10^4$
K_d (nM)	$1,78 \pm 0,3$	$1,26 \pm 0,2$	$3,45 \pm 0,4$
YG_5N-DOTA-^{111}In			
Linhagem Celular	LNCaP	PC-3	T-47D
B_{max} (fmol/mg)	$231,6 \pm 36,5$	$550,6 \pm 37,9$	$61,52 \pm 12,4$
B_{max} (rec/cel)	$(2,79 \pm 0,5) \times 10^5$	$(6,08 \pm 1,6) \times 10^5$	$(3,8 \pm 0,9) \times 10^4$
K_d (nM)	$1,77 \pm 0,5$	$1,29 \pm 0,4$	$3,16 \pm 1,3$

Dado: rec/cel = receptores por célula.

A diferença entre a ligação dos marcadores moleculares às células PC-3 e LNCaP pode decorrer de diferenças na carga final do complexo quelante-radioisótopo. Sabe-se que complexos de DOTA- ^{111}In são neutros, enquanto complexos DTPA- ^{111}In são carregados negativamente^{109; 110}. Resíduos ácidos ligados à membrana de células de mamíferos fazem com que a membrana apresente potencial negativo (potencial zeta)¹¹¹. Apesar da ligação dos marcadores moleculares às células tumorais ser receptor-específica, a carga negativa do YG_5N -DTPA- ^{111}In pode comprometer a interação com receptores por repulsão a regiões da membrana de forma não específica, comprometendo a ligação desse marcador molecular aos receptores ou a um subconjunto de receptores menos disponíveis na membrana das células.

7.4.2.4 Internalização e efluxo

A internalização do YG₅N-DTPA-¹¹¹In e do YG₅N-DOTA-¹¹¹In mediada por receptor foi analisada em células PC-3 aderentes, visto que essa linhagem celular demonstrou uma maior densidade de receptores para os marcadores moleculares nos ensaios de saturação (TAB. 23). A fração internalizada de ambos os marcadores moleculares atingiu um *plateau* de 90-95 % do total ligado à célula após apenas 30 minutos de incubação, indicando internalização rápida, específica e alta afinidade de ligação dos marcadores moleculares aos receptores (FIG. 52). Alta fração de internalização é característica de derivados da bombesina agonistas dos receptores BB₂, visto que antagonistas não são internalizados^{89; 112}.

FIGURA 52 – Fração internalizada dos marcadores moleculares e ligada à membrana das células PC-3 em função do tempo de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂.

Apesar da alta fração de internalização observada para ambos os marcadores moleculares, quando se compara a porcentagem do total adicionado internalizado por miligrama de proteína em função do tempo, observa-se que o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In é significativamente mais internalizado de 10 a 120 minutos de incubação ($p < 0,01$ para 10, 30 e 60 minutos e $p < 0,001$ para 120 minutos; FIG. 53). Conforme anteriormente discutido, apesar da afinidade semelhante dos marcadores moleculares pelos receptores presentes nas células, a carga negativa do marcador molecular conjugado ao quelante DTPA provavelmente compromete a interação com o receptor por repulsão a outras regiões da membrana celular, dificultando a ligação aos receptores ou a um subconjunto de receptores menos disponível na membrana, o que faz com que não

apenas a sua ligação às células, mas também com que sua internalização seja menor. Esses resultados diferem em relação a outros previamente publicados que demonstraram não haver diferença entre o perfil de internalização de derivados da bombesina conjugados ao DTPA ou ao DOTA, indicando que a influência do quelante pode variar de uma molécula para outra, mesmo quando elas pertencem a uma mesma classe²¹.

FIGURA 53 – Perfil de internalização (em porcentagem do total adicionado por miligrama de proteína) em função do tempo de incubação dos marcadores moleculares conjugados ao DTPA e ao DOTA em células PC-3 (n = 3).

O efluxo dos marcadores moleculares pelas células PC-3 foi avaliado por até 120 minutos e após 60 minutos de internalização e os resultados são apresentados na FIG. 54. Apesar das diferenças observadas em sua ligação e internalização, o efluxo dos marcadores moleculares pelas células PC-3 não foi estatisticamente diferente para todos os tempos analisados.

FIGURA 54 – Efluxo (em porcentagem do total internalizado) em função do tempo após 60 minutos de internalização dos marcadores moleculares conjugados ao DTPA e ao DOTA em células PC-3 (n = 3).

7.4.2.5 Análise da estabilidade em plasma de camundongo *in vitro*

Os resultados da análise da estabilidade e ligação às proteínas plasmáticas dos marcadores moleculares em plasma de camundongo *in vitro* são apresentados na TAB. 24. A estabilidade dos marcadores moleculares foi comparável até uma hora de incubação, mas o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In apresentou maior estabilidade do que o YG₅N-DTPA-¹¹¹In nos dois dias analisados após 4 e 24 horas de incubação. Apesar da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas dos marcadores moleculares ser semelhante, ela foi maior para o YG₅N-DTPA-¹¹¹In em todos os tempos e dias analisados.

TABELA 24 – Estabilidade e ligação às proteínas dos marcadores moleculares em plasma de camundongos *BALB/c in vitro* a 37 °C, determinado por CLAE.

Marcador molecular intacto (%)				
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
15 minutos	96,95	95,07	98,68	95,01
1 hora	94,24	91,46	95,15	94,46
4 horas	74,87	67,19	92,29	78,20
24 horas	14,55	11,72	47,55	27,20
Porcentagem de ligação às proteínas (%)				
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
15 minutos	9,48	9,46	8,25	9,20
1 hora	10,35	8,91	8,83	8,82
4 horas	9,04	8,95	8,57	8,38
24 horas	11,52	10,14	10,12	9,47

O perfil de CLAE dos marcadores moleculares incubados em plasma de camundongo pode ser visualizado na FIG. 55. O perfil do YG₅N-DTPA-¹¹¹In é semelhante ao obtido para o YG₅N-DOTA-¹¹¹In após incubação em soro humano em cada tempo (FIG. 55), com a diferença que o marcador molecular dá origem a uma espécie com tempo de retenção próximo ao marcador molecular íntegro (TR 15,5 ± 0,1 minutos) e posteriormente a espécies com tempo de retenção intermediário (TR 9,3 ± 0,1 minutos) e a uma espécie com TR curto (TR 1,9 ± 0,1 minutos), sendo essa a espécie predominante após 24 horas de incubação. As espécies de TR intermediário obtidas após incubação em soro de camundongo apresentam TR mais curto do que as espécies de TR intermediário produzidas após incubação em soro humano por até 4 horas e o mesmo TR da espécie de TR intermediário produzida após incubação em soro humano por 24 horas. Para o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In (TR 16,1 ± 0,1 minutos), as espécies predominantes após 24 horas de incubação são as de TR próximo ao marcador molecular íntegro e a espécie de TR intermediário.

Comparando-se os resultados de estabilidade e ligação às proteínas do marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In em plasma de camundongo e em soro humano (TAB. 17), observa-se uma degradação ligeiramente mais rápida e uma menor ligação às proteínas em soro humano. A menor ligação às proteínas do soro humano, ou seja, a maior fração de marcador molecular livre, provavelmente deixa o marcador molecular mais disponível para sofrer ação da atividade das enzimas séricas, o que faz com que sua degradação seja mais rápida.

FIGURA 55 – Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 150 mm x 4,0 mm, 5 µm; método B da seção 6.3.3.1) representativo do YG₅N-DTPA-¹¹¹In (A, B, C e D) e do YG₅N-DOTA-¹¹¹In (E, F, G e H) após incubação em soro de camundongo por 15 minutos (A e E), 1 hora (B e F), 4 horas (C e G) e 24 horas (D e H).

7.4.3 Estudos *in vivo*

7.4.3.1 Estudo de saturação e competição *in vivo* em camundongos com tumor de células PC-3

Os resultados da biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In na ausência (0,03 e 0,3 nmol) e presença de competidor (25 nmol do derivado não radiomarcado e 0,03 nmol do marcador molecular) podem ser visualizados na TAB. 25. Observa-se captação principalmente no tumor, nos órgãos que expressam os receptores BB₂ – pâncreas e intestinos¹¹ – e nos rins, órgão primário de excreção, quando 0,03 nmol do marcador molecular foi injetado por via endovenosa caudal. Quando a quantidade administrada aumentou para 0,3 nmol, a captação nos tecidos que expressam os receptores BB₂ não foi alterada significativamente ($p > 0,05$), indicando que não ocorre saturação dos receptores *in vivo* até essa condição. Esse dado é importante para evitar a saturação dos receptores *in vivo*, conforme observado *in vitro*. A saturação dos receptores *in vivo* pode ocorrer ao se injetar massas maiores de peptídeo, como por exemplo, para estudos de imagem, os quais requerem administração de maior atividade. Sendo assim, massa maior do que 0,3 nmol não foi administrada em todos os experimentos que envolveram a análise da ligação dos marcadores moleculares a receptores *in vivo*.

Quando 0,03 nmol do marcador molecular foram administrados concomitantemente com 25 nmol do derivado da bombesina não radiomarcado, observou-se redução significativa da captação do YG₅N-DOTA-¹¹¹In no tumor e no pâncreas ($p < 0,05$), indicando que a captação do marcador molecular pelas células que expressam os receptores BB₂ é específica. Apesar da captação intestinal não ter sido reduzida significativamente, pode-se observar uma tendência à redução com a diminuição da média de captação nesse órgão.

TABELA 25 – Biodistribuição do YG₅N-DOTA-¹¹¹In em camundongos *SCID* machos com tumor subcutâneo de células PC-3 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de diferentes massas de marcador molecular e na ausência e presença de bloqueador (25 nmol do YG₅N-DOTA).

Órgão	YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In (% AI/g de tecido ou mL de sangue)		
	0,03 nmol	0,3 nmol	0,03 nmol + 25 nmol de YG ₅ N-DOTA
Tumor	1,10 ± 0,3	1,32 ± 0,5	0,48 ± 0,1
Sangue	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,03 ± 0,0
Coração	0,01 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,06 ± 0,0
Pulmões	0,05 ± 0,0	0,06 ± 0,0	0,16 ± 0,1
Pâncreas	2,31 ± 0,8	3,63 ± 0,7	0,24 ± 0,0
Baço	0,35 ± 0,1	0,31 ± 0,1	0,17 ± 0,0
Estômago*	0,71 ± 0,1	0,34 ± 0,1	0,18 ± 0,1
Fígado	0,11 ± 0,0	0,19 ± 0,1	0,24 ± 0,0
Rins	2,38 ± 0,2	2,64 ± 1,4	3,74 ± 0,2
Intestinos*	1,33 ± 0,7	1,47 ± 0,5	0,86 ± 0,5
Músculo	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,13 ± 0,0

* Com conteúdo.

7.4.3.2 Estudos imagem, quantificação por imagem e biodistribuição em camundongos com tumor de células PC-3 ou LNCaP

Os estudos de imagem SPECT/CT foram realizados 1 e 4 horas após a administração endovenosa de 0,13 nmol dos marcadores moleculares (13 MBq; 350 µCi) YG₅N-DTPA-¹¹¹In, YG₅N-DOTA-¹¹¹In e do derivado da bombesina BZH3-¹¹¹In. O BZH3 foi escolhido por ser um dos derivados da bombesina descritos pela literatura que apresenta maior captação em tumor de células PC-3 e também alta captação pancreática e intestinal¹⁴. Recentemente foi objeto de um estudo clínico envolvendo pacientes com glioma recorrente e demonstrou ser uma ferramenta útil para estadiamento e diferenciação entre gliomas de baixo e alto grau¹¹³. Esse derivado foi radiomarcado com ¹¹¹In com alta pureza radioquímica utilizando o mesmo protocolo para marcação do

YG₅N-DOTA.

As imagens SPECT/CT obtidas para os animais com tumor de células PC-3 e LNCaP são apresentadas nas FIG. 56 e 57, respectivamente. As imagens de 1 e 4 horas de cada peptídeo foram reconstruídas utilizando a mesma escala de cores. Os tumores de células PC-3 foram facilmente identificados com os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In, YG₅N-DOTA-¹¹¹In e com o BZH3-¹¹¹In. Além dos tumores, captação abdominal também foi observada para os três derivados da bombesina, tendo sido visivelmente maior para o BZH3-¹¹¹In nos dois tempos estudados.

As imagens do tumor PC-3 obtidas com o marcador molecular conjugado ao DTPA e ao DOTA foram comparáveis e melhores do que as obtidas com o BZH3-¹¹¹In 1 hora após a administração, haja vista a maior captação deste último na região abdominal. Entretanto, ao se comparar as imagens desse tumor e do tumor de células LNCaP após 4 horas, observa-se que a melhor imagem foi obtida com o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In e com o BZH3-¹¹¹In.

FIGURA 56 – Imagens SPECT/CT de camundongos *beige SCID* machos com tumor de células PC-3 (indicado pelas setas brancas) utilizando os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In, YG₅N-DOTA-¹¹¹In e o derivado da bombesina BZH3-¹¹¹In. As imagens são representativas de três.

FIGURA 57 – Imagens SPECT/CT de camundongos *SCID* machos com tumor de células LNCaP no flanco esquerdo (indicado pelas setas brancas) utilizando os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In, YG₅N-DOTA-¹¹¹In e o derivado da bombesina BZH3-¹¹¹In. As imagens são representativas de três.

Os resultados de quantificação por imagem utilizando o programa InVivoScope (Bioscan, Inc.) são apresentados na TAB. 26. A captação nos tumores de células PC-3 1 hora após a administração foi maior para o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In em relação ao YG₅N-DTPA-¹¹¹In ($p = 0,013$), mas não em relação ao BZH3-¹¹¹In. A captação dos três peptídeos pelo tumor de células PC-3 4 horas após a administração foi comparável. Entretanto, as melhores imagens desse tumor obtidas com o YG₅N-DOTA-¹¹¹In podem ser explicadas por sua maior razão tumor:radiação de fundo (no caso avaliada pela captação no músculo). Ainda que não haja diferença significativa entre as razões tumor:músculo de todos os peptídeos 1 hora após a administração e entre a razão tumor:músculo do YG₅N-DTPA-¹¹¹In e do BZH3-¹¹¹In 4 horas após a administração, ela foi significativamente maior para o YG₅N-DOTA-¹¹¹In quando comparado ao YG₅N-DTPA-¹¹¹In ($p = 0,041$) e ao BZH3-¹¹¹In ($p = 0,015$) após esse tempo.

Para o tumor de LNCaP, a captação tumoral 1 hora após a administração foi maior para o derivado BZH3-¹¹¹In em relação ao marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In ($p = 0,019$) e comparável à captação do YG₅N-DTPA-¹¹¹In. A captação tumoral 4 horas após a administração, bem como as razões tumor:músculo para os três peptídeos nos dois tempos não foram estatisticamente diferentes. Apesar dessa semelhança, o tumor de LNCaP foi mais facilmente identificado com o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In e com o BZH3-¹¹¹In. Isso provavelmente se deve à maior concentração de radioatividade na bexiga com YG₅N-DTPA-¹¹¹In nos dois tempos, a qual dificultou a visualização do tumor.

As razões tumor:músculo deveriam, idealmente, aumentar de 1 para 4 horas após a administração, indicando que a radiação de fundo diminui com o tempo a uma taxa maior do que a captação tumoral. Entretanto, essa observação só ocorre para o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In nos animais com tumor de células PC-3, e as razões tumor:músculo permanecem constantes nos demais casos. Esse resultado é indicativo do rápido clareamento sanguíneo dos três peptídeos estudados, o qual reduz a radioatividade no sangue e nos órgãos não-alvo a um mínimo até 1 hora após a administração.

TABELA 26 – Quantificação da captação tumoral do YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In e do BZH3-¹¹¹In utilizando as imagens SPECT e o CT como referência (InVivoScope, Bioscan, Inc.) (n = 3).

Peptídeo radiomarcado	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In		BZH3- ¹¹¹ In	
Tempo	1 hora	4 horas	1 hora	4 horas	1 hora	4 horas
% AI/g						
Tumor PC-3						
Razão	2,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	3,1 ± 0,2	1,1 ± 0,4	2,5 ± 1,0	1,1 ± 0,1
Tumor PC-3:músculo	15,4	2,8	6,3	3,4	11,4	2,9
% AI/g						
Tumor LNCaP						
Razão	1,6 ± 0,6	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,6
Tumor LNCaP:músculo	3,5	10,0	12,9	26,3	6,4	6,6

Os resultados dos estudos de biodistribuição dos marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In e do BZH3-¹¹¹In (em % AI/g) e as razões tumor:órgãos calculadas em animais com tumor de células PC-3 e LNCaP 4 horas após a administração são apresentados nas TAB. 27 e 28, respectivamente. A captação no tumor de células PC-3 foi maior para o BZH3-¹¹¹In, seguido do YG₅N-DOTA-¹¹¹In e do YG₅N-DTPA-¹¹¹In (p < 0,05). Da mesma forma que para os estudos *in vitro*, o marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In apresentou menor ligação às células PC-3 *in vivo* em relação ao YG₅N-DOTA-¹¹¹In. Entretanto, essa diferença não foi observada para a captação no tumor de LNCaP (p > 0,05), a qual foi comparável para os três peptídeos. Além disso, apesar da menor expressão dos receptores BB₂ por essas células, a captação tumoral não foi menor, confirmando o resultado dos estudos de imagem que demonstraram que os peptídeos em estudo são efetivos para o diagnóstico de tumores que expressam esse receptor em quantidades menores.

TABELA 27 – Biodistribuição do YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In e do BZH3-¹¹¹In em camundongos *beige SCID* machos com tumor subcutâneo de células PC-3 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0.13 nmol (13 MBq, 350 µCi) de cada peptídeo radiomarcado (n = 3).

Órgão	Marcador molecular (% AI/g de tecido ou mL de sangue)		
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	BZH3- ¹¹¹ In
Tumor	0,49 ± 0,1	0,81 ± 0,1	1,40 ± 0,2
Sangue	0,07 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,06 ± 0,0
Coração	0,05 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,07 ± 0,0
Pulmões	0,09 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,15 ± 0,0
Pâncreas	2,00 ± 0,7	2,47 ± 0,5	8,37 ± 1,5
Baço	0,22 ± 0,1	0,34 ± 0,1	0,46 ± 0,0
Estômago *	0,33 ± 0,1	0,36 ± 0,2	0,50 ± 0,2
Fígado	0,30 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,69 ± 0,1
Rins	2,68 ± 0,4	2,48 ± 0,6	2,87 ± 0,7
Intestino delgado *	0,33 ± 0,1	0,46 ± 0,0	1,13 ± 0,1
Intestino grosso *	1,80 ± 0,4	3,38 ± 1,0	4,51 ± 0,4
Músculo	0,09 ± 0,1	0,14 ± 0,2	0,26 ± 0,2
Razões tumor:órgãos			
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	BZH3- ¹¹¹ In
Tumor:Pâncreas	0,50	0,62	0,13
Tumor:Rins	0,40	0,30	0,65
Tumor:Fígado	9,50	5,80	2,02
Tumor:Músculo	5,44	5,79	5,38

* Com conteúdo.

TABELA 28 – Biodistribuição do YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In e do BZH3-¹¹¹In em camundongos *SCID* machos com tumor subcutâneo de células LNCaP 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0.13 nmol (13 MBq, 350 µCi) de cada peptídeo radiomarcado (n = 3).

Órgão	Marcador molecular (% AI/g de tecido ou mL de sangue)		
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	BZH3- ¹¹¹ In
Tumor	1,05 ± 0,1	1,33 ± 0,1	1,50 ± 0,4
Sangue	0,07 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,05 ± 0,0
Coração	0,07 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,04 ± 0,0
Pulmões	0,13 ± 0,0	0,07 ± 0,0	0,14 ± 0,1
Pâncreas	1,68 ± 0,5	2,64 ± 0,6	11,14 ± 3,1
Baço	0,29 ± 0,2	0,27 ± 0,1	0,35 ± 0,3
Estômago *	0,10 ± 0,0	0,22 ± 0,1	0,50 ± 0,4
Fígado	0,18 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,74 ± 0,0
Rins	3,43 ± 0,1	3,27 ± 0,2	2,30 ± 0,2
Intestino delgado *	0,21 ± 0,0	0,59 ± 0,2	0,79 ± 0,3
Intestino grosso *	1,54 ± 0,1	2,02 ± 0,9	4,11 ± 0,9
Músculo	0,04 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,03 ± 0,0
Razões tumor:órgãos			
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	BZH3- ¹¹¹ In
Tumor:Pâncreas	0,62	0,50	0,13
Tumor:Rins	0,30	0,40	0,65
Tumor:Fígado	5,80	9,50	2,02
Tumor:Músculo	26,25	133	50

* Com conteúdo.

Conforme discutido anteriormente, as razões tumor:músculo indicam o contraste entre a captação tumoral e a radiação de fundo, uma vez que o músculo não apresenta receptores para os peptídeos radiomarcados e sua captação decorre apenas da vascularização no órgão. Da mesma forma que os resultados de quantificação por imagem e apesar da diferença na captação tumoral, as razões tumor:músculo no tumor

de células PC-3 foi semelhante para os três peptídeos, o que permitiu a visualização do tumor utilizando qualquer um dos três peptídeos. Entretanto, em contraste com as razões tumor:músculo calculadas pelas imagens, as razões calculadas pela biodistribuição para o tumor LNCaP foram diferentes, sendo maior para o YG₅-DOTA-¹¹¹In, seguido do BZH3-¹¹¹In e do YG₅-DTPA-¹¹¹In. Esse resultado está de acordo com a melhor imagem do tumor de LNCaP obtida com o YG₅-DOTA-¹¹¹In e com BZH3-¹¹¹In, em relação ao YG₅-DTPA-¹¹¹In.

O perfil de biodistribuição de moléculas radiomarcadas não depende apenas de sua interação com o receptor, mas também da carga e lipofilicidade dos compostos, as quais influenciam diretamente no clareamento sanguíneo e no sequestro da radiação por órgãos não-alvo. Compostos mais lipofílicos apresentam maior captação hepática e menor excreção renal do que compostos hidrofílicos ou que apresentam carga¹⁰¹. Apesar da lipofilicidade dos marcadores moleculares e do BZH3-¹¹¹In terem sido analisadas comparativamente apenas pelo cálculo de coeficiente de partição teórico, o resultado *in vivo* confirmou o resultado de log P teórico, uma vez que se observa maior captação hepática e menores razões tumor:fígado para esse último nos dois estudos de biodistribuição realizados, indicando que esse derivado é mais lipossolúvel. Essa maior lipofilicidade provavelmente reduziu o clareamento sanguíneo do BZH3-¹¹¹In, bem como dos demais órgãos, fazendo com que as razões tumor:órgãos e o contraste tumor:radiação de fundo das imagens para esse derivado tenham sido menos favoráveis do que para o YG₅-DTPA-¹¹¹In e YG₅-DOTA-¹¹¹In.

O BZH3-¹¹¹In apresentou a maior captação no pâncreas e no intestino grosso, no qual o cólon é a porção que expressa os receptores BB₂. Entretanto, apesar da maior ligação desse derivado ao tumor de células PC-3 e aos tecidos positivos para BB₂, as razões tumor:pâncreas são mais favoráveis para os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In, especialmente para o tumor de LNCaP, indicando que o aumento na captação pancreática não aumenta proporcionalmente a captação tumoral. Esses resultados confirmam dados da literatura que demonstraram não haver relação direta entre captação pancreática e tumoral⁹⁹.

Os resultados de captação tumoral e pancreática absoluta obtidos para o BZH3-¹¹¹In foram menores do que previamente publicados para o BZH3-⁶⁸Ga¹⁴ e

diferenças semelhantes foram reportadas para outros derivados da bombesina⁶¹. Essas diferenças provavelmente decorrem de variações na raça e origem dos camundongos utilizados, nas células tumorais (origem, passagem e forma de cultivo) e no tamanho e vascularização do tumor⁶¹. A inclusão do BZH3 nesse estudo foi com o objetivo de eliminar as influências desses fatores por meio da comparação direta de suas propriedades biológicas com as propriedades dos marcadores moleculares, sob as mesmas condições.

7.4.3.3 Estudos de estabilidade *in vivo*

Na TAB. 29 apresentam-se os resultados de estabilidade dos marcadores moleculares em soro de camundongo *in vivo*. Pode-se observar que ambos os marcadores moleculares apresentaram baixa estabilidade nessas condições, sendo o YG₅N-DOTA-¹¹¹In o mais estável 5 minutos após a administração em dois dos camundongos analisados. Apesar da baixa estabilidade, os marcadores moleculares foram capazes de se ligar às células tumorais *in vivo*, conforme demonstrado pelos estudos de imagem e biodistribuição descritos anteriormente, provavelmente em razão de seu rápido clareamento sanguíneo. Esse rápido clareamento sanguíneo fica evidenciado pela baixa ligação às proteínas plasmáticas *in vivo*, como verificado *in vitro*.

A degradação dos marcadores moleculares *in vivo* foi muito mais rápida do que a observada *in vitro*. Isso ocorre porque a estabilidade *in vivo* é dependente dos mecanismos de distribuição, metabolismo (principalmente pelas enzimas plasmáticas e hepáticas) e eliminação, os quais ocorrem simultaneamente no animal, enquanto a estabilidade *in vitro* é dependente apenas do metabolismo pelas enzimas plasmáticas.

O perfil de degradação dos marcadores moleculares *in vivo* (não mostrado) é semelhante ao observado *in vitro* em plasma de camundongo, com formação de uma espécie de TR intermediário, predominante 5 minutos após a administração, que é substituída por uma espécie de TR curto, predominante 15 minutos após a administração.

TABELA 29 – Estabilidade e ligação às proteínas dos marcadores moleculares em soro de camundongos *BALB/c in vivo* 5 e 15 minutos após a administração, determinado por CLAE.

Marcador molecular intacto (%)				
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	
	5 minutos	15 minutos	5 minutos	15 minutos
Camundongo 1	0	0	18,79	0
Camundongo 2	5,90	0	15,08	0
Camundongo 3	5,85	0	3,82	0
Porcentagem de ligação às proteínas (%)				
	YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In		YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	
	5 minutos	15 minutos	5 minutos	15 minutos
Camundongo 1	14,31	12,97	8,57	8,75
Camundongo 2	16,97	12,45	9,29	10,31
Camundongo 3	15,18	13,18	9,68	9,48

Os resultados de estabilidade dos marcadores moleculares no tumor de células PC-3, no pâncreas e nos rins de camundongos são apresentados na TAB. 30. A estabilidade no tumor foi maior para o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In e para o BZH3-¹¹¹In do que para o YG₅N-DTPA-¹¹¹In nos dois camundongos analisados. Já a estabilidade no pâncreas foi variável de um camundongo para outro, mas maior para o YG₅N-DOTA-¹¹¹In. Essa variabilidade provavelmente decorre da diferença de atividade enzimática entre os pâncreas dos camundongos. Já a baixa estabilidade renal dos três peptídeos sugere que eles não são excretados íntegros pela urina.

TABELA 30 – Estabilidade dos marcadores moleculares e do BZH₃-¹¹¹In no tumor de células PC-3 e em tecidos de camundongos *SCID in vivo* 1 hora após a administração, determinado por CLAE. Dado: C = camundongo.

Marcador molecular intacto (%)						
Tecido	Tumor		Pâncreas		Rins	
Peptídeo	C1	C2	C1	C2	C1	C2
YG ₅ N-DTPA- ¹¹¹ In	30,7	14,0	10,5	3,0	15,9	0,0
YG ₅ N-DOTA- ¹¹¹ In	78,9	75,8	26,8	44,8	19,9	0,0
BZH ₃ - ¹¹¹ In	76,4	66,1	5,5	7,8	0,0	2,0

A estabilidade dos marcadores moleculares no tumor foi maior do que a estabilidade no plasma de camundongo *in vivo*. Além da diferença de atividade enzimática entre plasma e tumor e da presença dos marcadores moleculares intactos no sangue depender dos mecanismos de distribuição, metabolismo e excreção, um fator chave a se considerar é o pH do tumor¹¹⁴. Vários estudos demonstram que o pH extracelular na região tumoral é permanentemente ácido e pode chegar a 6,0^{115; 116}. Uma vez que tumores sólidos se desenvolvem mais rapidamente do que os vasos sanguíneos que os irrigam, um microambiente hipóxico se forma na região em que a massa tumoral se encontra, resultando em altas taxas glicólise e pH ácido. Além disso, a baixa perfusão sanguínea no local dificulta a remoção dos metabólitos da glicólise e também leva à hipóxia regional, o que exacerba fermentação anaeróbia e reduz ainda mais o pH⁷⁹. Esse pH menor pode influenciar não apenas na ligação dos marcadores moleculares às células tumorais, como também em sua estabilidade, aumentando-a em relação ao sangue, cujo pH é 7,4. A fração de espécies ionizadas e não ionizadas se alteram com o pH, alterando também o coeficiente de partição dos derivados da bombesina, conforme anteriormente demonstrado pelos cálculos de log D.

7.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados discutidos anteriormente, pode-se concluir que:

- ✓ o derivado da bombesina YG₅N-DOTA pode ser radiomarcado com ¹¹¹In, mas a atividade específica máxima obtida foi menor do que para o derivado YG₅N-DTPA radiomarcado com ¹¹¹In;
- ✓ dentre as linhagens celulares tumorais estudadas, os derivados da bombesina foram capazes de se ligar às células LNCaP e PC-3 de tumor de próstata e às células T-47D de tumor de mama;
- ✓ o marcador molecular conjugado ao DOTA apresenta afinidade semelhante ao conjugado ao DTPA pelos receptores, mas este último se liga menos e é menos internalizado;
- ✓ o marcador molecular conjugado ao DOTA apresenta maior estabilidade *in vitro* em plasma de camundongo e *in vivo* em soro de camundongo e no tumor de células PC-3;
- ✓ os marcadores moleculares apresentam ligação específica às células PC-3 *in vivo*;
- ✓ o marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In apresentou maior captação tumoral do que o YG₅N-DTPA-¹¹¹In no tumor de células PC-3 e a captação tumoral pelo tumor de células LNCaP foi semelhante para os dois marcadores moleculares, bem como a captação pancreática e intestinal;
- ✓ apesar da menor captação pelo tumor de células PC-3, tanto o YG₅N-DTPA-¹¹¹In quanto o YG₅N-DOTA-¹¹¹In foram ferramentas úteis para imagem desses tumores *in vivo* e apresentam a vantagem da menor captação abdominal e razões tumor:tecidos saudáveis mais favoráveis, quando comparados ao derivado da bombesina BZH3-¹¹¹In;
- ✓ tanto o agente quelante DTPA quanto o agente quelante DOTA são adequados para conjugação ao derivado da bombesina YG₅N para aplicação *in vivo* e permitem a imagem de tumores que expressam os receptores BB₂, mas, por apresentar maior estabilidade *in vivo*, o derivado YG₅N-DOTA foi escolhido para radiomarcagem para aplicação em PET, conforme descrito no capítulo a seguir.

MARCADORES MOLECULARES PARA PET

Neste capítulo apresentam-se a revisão bibliográfica, os métodos, resultados e discussões e conclusões relativos à radiomarcagem do derivado da bombesina YG₅N conjugado ao DOTA com ⁶⁸Ga para aplicação em PET, com ênfase na síntese e estabilidade do marcador molecular, bem como em seu perfil de biodistribuição em animais saudáveis e com tumor de células PC-3.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- ✓ Definir os parâmetros para radiomarcagem do YG₅N-DOTA com ⁶⁸Ga com alta pureza radioquímica e alta atividade específica;
- ✓ radiomarcar o YG₅N-DOTA com ⁶⁸Ga com a mais alta atividade específica em bancada e utilizando um sistema automatizado;
- ✓ avaliar a estabilidade do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga;
- ✓ caracterizar o perfil de biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga em animais saudáveis e com tumor de células PC-3 e compará-lo ao obtido para os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In;
- ✓ discutir o potencial de aplicação *in vivo* do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga no diagnóstico de tumores que expressam o receptor BB₂ por PET.

8.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento no interesse das aplicações clínicas de radiofármacos para imagem tumoral utilizando a tomografia por emissão de pósitrons devido ao sucesso da glicose marcada com ^{18}F (fluordesoxiglicose; FDG- ^{18}F). Ainda que a FDG- ^{18}F tenha sido extensivamente utilizada para diagnóstico de uma série de tumores, esse composto é um marcador do metabolismo de glicose, sendo sua sensibilidade e a especificidade variável entre os diversos tipos de câncer. As limitações na imagem com FDG- ^{18}F ; tais como incapacidade de diferenciação entre inflamação e recidiva tumoral pós-cirurgia, imagem ruim de tumores com crescimento lento e alta captação cerebral, abrem espaço para o desenvolvimento de novos radiofármacos para aplicação em PET. Os alvos desses novos radiofármacos no tecido tumoral são o DNA, antígenos, hipóxia e receptores de superfície e os radioisótopos mais promissores, além do ^{18}F , são o carbono-11 (^{11}C), o cobre-64 (^{64}Cu), o zircônio-89 (^{89}Zr), o iodo-124 (^{124}I) e o ^{68}Ga ¹¹⁷.

O ^{68}Ga é um radioisótopo de gerador com meia-vida de 68 minutos. Decai primariamente por emissão de pósitrons de 1,92 MeV de energia e 89 % de abundância. O gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ consiste em uma coluna de alumina, dióxido de estanho ou titânio e o ^{68}Ga pode ser frequentemente eluído com HCl 0,1 M. Devido à longa meia-vida do ^{68}Ge (271 dias), o gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ pode ser utilizado por até um ano, permitindo a aquisição de imagens PET nas unidades de medicina nuclear sem a necessidade da presença de um ciclotron. Além disso, a meia-vida do ^{68}Ga permite a realização de sínteses em múltiplas etapas, a purificação do radiofármaco e a aquisição de imagens por tempos mais longos. DOTA e NOTA são agentes quelantes utilizados para acoplamento do ^{68}Ga à molécula^{104; 118}. Apesar de descoberto na década de 60, esse radioisótopo só ganhou visibilidade há cerca de 15 anos, devido ao crescimento da técnica PET, da disponibilidade e da possibilidade de produção rotineira e a custo acessível, na forma de gerador¹¹⁹.

Poucos trabalhos descrevem a radiomarcagem de derivados da bombesina com ^{68}Ga e sua avaliação *in vivo*. Schuhmacher e colaboradores¹⁴ radiomarcaram o derivado da bombesina BZH3, comparado com os marcadores moleculares YG₅N-DTPA e YG₅N-DOTA no capítulo anterior, com esse radioisótopo a 90 °C após a completa evaporação do HCl 0,5 M do eluato do gerador e dissolução em tampão acetato 0,1 M pH

4,8. O ^{68}Ga não ligado foi removido das preparações utilizando-se uma mini-coluna compacta do tipo Sep-Pak (C_{18}). A pureza radioquímica do $\text{BZH3-}^{68}\text{Ga}$, determinada por CCD e CLAE, foi maior do que 98 %, obtendo-se uma atividade específica de 37-44 MBq/nmol. O $\text{BZH3-}^{68}\text{Ga}$ apresentou alta captação tumoral (aproximadamente 8 % da atividade injetada por grama de tumor – AI/g) nas células de tumor de pâncreas de rato (AR42J), excreção renal e elevada captação pancreática (35 % AI/g).

O antagonista dos receptores BB_2 , RM1 (20 μg), cuja radiomarcagem com ^{111}In e avaliação *in vivo* foi descrita no capítulo 6, foi também radiomarcado com ^{68}Ga (150 MBq) em tampão HEPES 0,25 M pH 3,6-3,9, a 95 °C por 5 minutos. Nessas condições, obteve-se pureza radioquímica maior que 95 % e atividade específica de 30 GBq/ μmol , e a visualização do tumor por PET/CT foi possível, apesar da alta captação abdominal observada⁸⁶.

Liu e colaboradores¹⁵ radiomarcaram a BBN e o peptídeo heterodimérico RGD-BBN complexados ao quelante NOTA para imagem simultânea de tumores que superexpressam receptores para bombesina e integrina $\alpha_v\beta_3$. Os peptídeos (5 nmol) foram dissolvidos em tampão acetato 0,1 M e incubados com 148 MBq de ^{68}Ga por 15 minutos a 40 °C. Ao final das reações, os peptídeos radiomarcados foram purificados por meio de um sistema de CLAE analítico, obtendo-se pureza radioquímica maior do que 90 %, e submetidos à avaliação *in vitro* e *in vivo* em células de tumor de mama MDA-MB-435 e T-47D. As células T-47D apresentaram maior captação dos radiofármacos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os autores não apresentaram os dados de captação pancreática, mas as imagens mostram alta captação abdominal, a qual prejudicou a visualização do tumor.

O derivado da bombesina AMBA, cuja marcação com ^{111}In foi descrita anteriormente no capítulo 6, foi radiomarcado com ^{68}Ga utilizando um sistema automatizado, seguido da purificação por Sep-Pak C_{18} e CLAE. O tempo de síntese com purificação por Sep-Pak C_{18} foi de 20 minutos e com purificação por CLAE foi de 40 minutos. O derivado da bombesina radiomarcado com ^{68}Ga apresentou alta afinidade, alta internalização e baixo efluxo pelos receptores nas células PC-3 e o perfil de biodistribuição foi semelhante ao derivado radiomarcado com ^{111}In , ^{67}Ga e ^{177}Lu ⁶⁷. O $\text{AMBA-}^{68}\text{Ga}$ foi inserido em um estudo comparativo com a metilcolina radiomarcada com ^{18}F ($\text{FCH-}^{18}\text{F}$) em um modelo animal de tumor de próstata subcutâneo com as células VCaP, mostrando-se superior do que a $\text{FCH-}^{18}\text{F}$ para o diagnóstico desses tumores devido

ao melhor contraste entre tumor e radiação de fundo⁵².

O antagonista da BBN RM2 também foi radiomarcado com ^{68}Ga e avaliado quanto à afinidade pelas células PC-3 *in vivo* e *in vitro*. Esse antagonista apresentou ligação específica e de alta afinidade e baixa internalização pelas células PC-3 *in vitro* e alta captação tumoral e pelos tecidos sadios nos estudos *in vivo*. Entretanto, confirmando a característica dos antagonistas, o clareamento dos tecidos sadios é mais rápido do que do tumor⁸⁹.

O agonista da bombesina BZH3- ^{68}Ga , que se liga aos três receptores para o peptídeo – BB₁, BB₂ e BB₃ – foi avaliado em dois estudos clínicos. No primeiro, foi comparado ao radiofármaco FDG- ^{18}F para detecção de tumores de estroma gastrointestinais em 17 pacientes e mostrou-se inferior ao FDG- ^{18}F ¹²⁰. No segundo estudo, foi utilizado em conjunto com o FDG- ^{18}F em 15 pacientes com glioma recorrente, a fim de caracterizar a presença de receptores para bombesina nos tumores e determinar seu grau. O BZH3- ^{68}Ga mostrou-se uma ferramenta útil para diferenciação entre gliomas de baixo e alto grau. A análise conjunta do influxo de FDG- ^{18}F e da ligação do BZH3- ^{68}Ga às células tumorais permitiu a correta classificação dos gliomas em 100 % dos casos¹¹³.

A pouca variedade de protocolos de marcação de derivados da bombesina com gálio-68 indica que é necessário estudar os parâmetros da reação para uma série específica de peptídeos, a fim de obter alta pureza radioquímica associada à atividade específica satisfatória, sem perda da integridade proteica. Os protocolos de marcação dependem primariamente do agente quelante ligado, da presença de carreador na amostra de radionuclídeo, do peptídeo que se deseja radiomarcado e, no caso específico de radioisótopos de gerador, do tempo de utilização do gerador, do tempo decorrido desde a última eluição e da composição do eluato do gerador. Uma vez determinados os parâmetros de marcação, faz-se necessário avaliar o perfil de distribuição biológica e a ligação às células tumorais *in vivo*, a fim de avaliar o seu potencial para aplicação no diagnóstico por PET.

8.3 MATERIAIS E MÉTODOS

8.3.1 Infraestrutura

Os ensaios compreendidos nesta etapa do trabalho foram realizados nos

laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento de Radiofármacos da Instalação de Radiofarmácia da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF), no laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia (CB) e no Biotério, todos sediados no IPEN. Esses laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais, respectivamente.

8.3.2 Materiais

8.3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ ácido clorídrico (HCl) 30 % ultrapuro (Merck, Alemanha);
- ✓ acetona ultrapura (Merck, Alemanha);
- ✓ citrato de sódio p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ álcool metílico p.a. (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido cítrico p.a. (Merck, Alemanha).

Os reagentes utilizados e não listados acima são de mesma origem dos reagentes listados no capítulo 6, seção 6.3.2.1, e no capítulo 7, seção 7.3.2.1.

8.3.2.2 Equipamentos, materiais e sistemas

Os equipamentos, materiais e sistemas utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ de 50 mCi (1850 MBq) (Eckert e Ziegler Eurotope, Alemanha);
- ✓ módulo automático para síntese de peptídeos radiomarcados com ^{68}Ga Modular-Lab Pharm Tracer (Eckert e Ziegler Eurotope, Alemanha);
- ✓ cassete para marcação estéril e apirogênico (Eckert e Ziegler Eurotope, Alemanha).

Os equipamentos, materiais e sistemas utilizados e não listados acima são de mesma origem dos listados no capítulo 6, seção 6.3.2.2, e no capítulo 7, seção 7.3.2.2.

8.3.2.3 Tampões e soluções

Os principais tampões e soluções utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ Solução de HCl 0,02 M em acetona ultrapura;

- ✓ solução de HCl 0,1 M;
- ✓ solução de etanol 50 %;
- ✓ tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0;
- ✓ tampão citrato 0,1 M pH 5,0.

Os tampões e soluções utilizados e não listados acima foram listados anteriormente no capítulo 6, seção 6.3.2.3, e no capítulo 7, seção 7.3.2.3.

8.3.2.4 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos *BALB/c*, de seis a dez semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso, e *Nude*, de seis a dez semanas de idade e 15 a 20 gramas de peso, machos (Biotério – IPEN). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

8.3.3 Métodos

8.3.3.1 Metodologias analíticas

A) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Estudos preliminares foram realizados a fim de determinar o melhor sistema de CCD para determinação da pureza radioquímica das marcações com ^{68}Ga . Aplicou-se uma alíquota da mistura de radiomarcagem sobre as fitas de sílica gel 60 (1,2 x 10 cm) e procedeu-se à cromatografia utilizando como fase móvel tampão citrato 0,1 M pH 5,0. Nesse sistema, o marcador molecular permanece na origem da fita (R_f) 0,0 – 0,1, enquanto o $^{68}\text{GaCl}_3$ migra com R_f 0,7 – 1,0.

B) Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O sistema de CLAE utilizado foi anteriormente descrito no capítulo 6, seção 6.3.3.1 (B). Procedeu-se à cromatografia em fase reversa em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C_{18} (Waters, 150 mm x 4,0 mm, 5 μm) e detector de radiação gama (Shell Jr.). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/minuto com gradiente linear de 10 a 40 % (v/v) de TFA: CH_3CN (1:1000 v/v) em TFA: H_2O (1:1000 v/v)

por 20 minutos, retornando ao estado inicial por cinco minutos para estabilização do sistema.

8.3.3.2 Desenvolvimento de método de marcação do YG₅N-DOTA com ⁶⁸Ga

Os estudos de radiomarcacão foram realizados com o derivado da bombesina YG₅-DOTA, a fim de estabelecer uma condicão padrão para marcação com ⁶⁸Ga. O ⁶⁸GaCl₃ foi eluído do gerador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga utilizando uma solucão 0,1 M de HCl ultrapuro, foi purificado em coluna de troca catiônica do módulo automático para síntese de peptídeos e recuperado em 800 µL de HCl 0,02 M em acetona ultrapura. O volume da solucão de ⁶⁸GaCl₃ foi reduzido a 50 µL por evaporação a 95 °C por 8 minutos antes das marcações. Todos os reagentes aquosos utilizados nas reações foram preparados com água purificada por equipamento de osmose reversa e tratada com resina Chelex 100 para remoção de íons metálicos.

Os parâmetros otimizados foram massa de peptídeo (20 a 70 µg), atividade de ⁶⁸GaCl₃ (5 a 20 mCi; 185 a 740 MBq) e tempo de reação (8 a 30 minutos). O pH foi mantido em 4,0 com tampão acetato de sódio 0,2 M, a temperatura em 95 °C e o volume de reação em 300 µL. Ao final das reações, determinou-se a pureza radioquímica por CCD e CLAE, conforme descrito anteriormente na seção 8.3.3.1.

8.3.3.3 Purificação do marcador molecular

Quando a pureza radioquímica das reações foi menor do que 95 %, foi necessário purificar o marcador molecular. Para tal, condicionou-se uma coluna compacta Sep-Pak C18 com 5 mL de metanol p.a. e 5 mL de água destilada contendo 0,1 % de TFA. Aplicou-se a mistura de marcação na coluna e eluiu-se com 4 mL de água destilada contendo 0,1 % de TFA para remoção do ⁶⁸GaCl₃ livre e 4 mL de etanol para remoção do marcador molecular. Determinou-se a pureza radioquímica do marcador molecular purificado por CLAE, conforme descrito anteriormente na seção 8.3.3.1.

8.3.3.4 Síntese automatizada do YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga

As marcações do peptídeo YG₅N-DOTA foram realizadas utilizando o módulo automático Modular-Lab Pharm Tracer (FIG. 58), equipado com computador com

programa para operação do módulo e cassetes para marcação e purificação do peptídeo DOTATATO (FIG. 59).

FIGURA 58 – Módulo automático Modular-Lab Pharm Tracer utilizado para marcação automatizada do YG₅N-DOTA com ⁶⁸Ga.

FIGURA 59 – Cassete para marcação do DOTATATO com ⁶⁸Ga que foi utilizado para marcação do YG₅N-DOTA.

Inicialmente, montou-se o cassete no módulo automático (FIG. 60) e realizou-se um teste de pressão no sistema utilizando o programa apropriado. Conectou-se a entrada da mangueira do gerador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga a um frasco contendo 10 mL de HCl 0,1 M

e depois conectou-se a mangueira de saída do gerador na entrada do cassete de marcação. Em seguida, os frascos de NaCl 0,9 % (p/v) e de etanol 50 % foram colocados nas suas posições indicadas no programa, conectou-se uma agulha de respiro na tampa do frasco onde se coloca a solução eluente de HCl em acetona 98 % e adicionou-se 3 mL dessa solução ao frasco. Preparou-se 60 µg de peptídeo em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0 contendo ou não etanol (5 % v/v) e transferiu-se a solução para o frasco de reação do sistema automatizado. Procedeu-se à checagem do sistema utilizando o programa apropriado e iniciou-se a síntese. Ao final das reações, determinou-se a pureza radioquímica por CLAE, conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram realizados em duplicata.

FIGURA 60 – Módulo automático montado com o cassete para marcação. Os números indicam a posição do gerador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (1); dos frascos contendo NaCl 0,9 % p/v e etanol 50 % (2); do frasco de reação (3); do frasco do resíduo (4) e do produto final (5).

8.3.3.5 Análise da estabilidade do $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{68}\text{Ga}$

O $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{68}\text{Ga}$ (28 GBq/µmol), produzido por síntese automatizada na ausência e presença de 5% etanol, foi mantido a temperatura ambiente por até 3 horas. Após 1 e 3 horas, uma alíquota foi retirada para análise por CLAE, conforme descrito anteriormente na seção 8.3.3.1, a fim de investigar a presença de produtos de radiólise no meio. Os experimentos foram realizados em duplicata.

8.3.3.6 Cultivo celular

As células PC-3 de adenocarcinoma prostático humano grau IV (Hemocentro da Unicamp) foram cultivadas como descrito no capítulo 6, seção 6.3.3.9.

8.3.3.7 Estudos de biodistribuição em camundongos *BALB/c* sadios e *Nude* com tumor PC-3

Os marcadores moleculares (11 MBq, 300 μ Ci, 0,3 nmol), diluídos em 100 μ L de solução de NaCl 0,9 %) foram administrados por via endovenosa caudal. Após 1 ou 4 horas, os estudos de biodistribuição foram realizados conforme descrito anteriormente no capítulo 6, seção 6.3.3.7. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

O modelo animal de tumor prostático foi desenvolvido conforme descrito no capítulo 6, seção 6.3.3.10, e os estudos de biodistribuição foram realizados em quintuplicata da mesma forma que para os animais *BALB/c*.

8.3.3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como Média (Amplitude) quando $n = 2$ ou Média $\pm$ Erro Padrão (ensaios *in vitro*) e Média $\pm$ Desvio Padrão (ensaios *in vivo*) quando $n \geq 3$. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando o teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação de pares. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.4.1 Desenvolvimento de método de marcação do YG₅N-DOTA com ⁶⁸Ga

Na TAB. 31 apresentam-se os resultados da análise da pureza radioquímica, determinada por CCD e CLAE, das marcações de diferentes massas de YG₅-DOTA com 185 MBq de ⁶⁸GaCl₃. Pode-se observar que o aumento da massa aumenta gradativamente a pureza radioquímica das reações. As massas que conferiram maior pureza radioquímica

às reações foram maiores que 50 µg, sendo 60 µg a massa escolhida para a realização dos demais experimentos.

TABELA 31 – Pureza radioquímica do YG₅-DOTA-⁶⁸Ga determinada por CCD e CLAE após diferentes massas de YG₅-DOTA reagirem com 185 MBq de ⁶⁸GaCl₃ por 30 minutos, 95 °C e pH 4,0 (n = 2).

Massa de YG ₅ -DOTA (µg)	Pureza Radioquímica (%)	
	CCD	CLAE
20	45,39 (0,4)	19,41 (0,2)
30	69,72 (4,2)	46,36 (2,4)
40	81,38 (7,2)	54,65 (2,1)
50	89,17 (4,0)	67,20 (5,4)
60	79,76 (3,2)	77,79 (11,9)
70	89,79 (3,6)	71,29 (2,0)

Com base na TAB. 31, pode-se observar também que há diferenças entre os valores de pureza radioquímica determinada por CCD e CLAE. Isso se deve, provavelmente, à incapacidade da CCD de separar o marcador molecular de outros produtos da reação, provavelmente decorrentes da radiólise durante a reação, e que aparecem no perfil de CLAE do marcador molecular (FIG. 61). A CCD separa o marcador molecular do ⁶⁸GaCl₃ não ligado, que representa apenas uma pequena fração da mistura de radiomarcção, presente em menor proporção em relação a outros produtos da reação que não o marcador molecular.

FIGURA 61 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG₅-DOTA-⁶⁸Ga produzido após a reação de 20 (A); 30 (B); 40 (C); 50 (D); 60 (E) and 70 µg (F) de YG₅-DOTA com 185 MBq de ⁶⁸GaCl₃ por 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸GaCl₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR mais curto que o marcador molecular.

Fixou-se a massa de YG₅-DOTA em 60 µg para que o efeito da atividade crescente de ⁶⁸GaCl₃ sobre a pureza radioquímica das reações fosse estudado. Os resultados dessas análises, determinados por CCD e CLAE, são apresentados na TAB. 32. Não foram observadas diferenças significativas entre a pureza radioquímica, determinada por CCD, do YG₅-DOTA-⁶⁸Ga radiomarcado com as três atividades de radioisótopo. Entretanto, da mesma forma que para as reações com diferentes massas de peptídeo, diferenças significativas foram observadas entre a pureza radioquímica calculada por CCD e CLAE quando 370 (p < 0,01) e 740 MBq (p < 0,001) de ⁶⁸Ga foram utilizados nas reações.

TABELA 32 – Pureza radioquímica do YG₅-DOTA-⁶⁸Ga determinada por CCD e CLAE após 60 µg de YG₅-DOTA reagirem com diferentes atividades de ⁶⁸GaCl₃ por 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0 (n = 3).

Atividade de ⁶⁸ GaCl ₃ (MBq / mCi)	Pureza Radioquímica (%)	
	CCD	CLAE
185 / 5,0	94,68 ± 1,3	89,39 ± 2,8
370 / 10,0	89,00 ± 5,0	73,52 ± 5,2
740 / 20,0	93,50 ± 1,1	72,93 ± 5,3

Os perfis de CLAE do YG₅-DOTA-⁶⁸Ga radiomarcado com as diferentes atividades de radioisótopo são mostrados na FIG. 62. Observa-se que a diminuição da pureza radioquímica determinada por CLAE não decorre do aumento do ⁶⁸GaCl₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos) nas reações, mas sim do aumento de um outro produto da reação, provavelmente um produto de radiólise. O aumento desse produto com o aumento da atividade no meio de reação sugere que seu aparecimento é dependente da atividade.

FIGURA 62 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG₅-DOTA-⁶⁸Ga (TR 15,8 ± 0,2 minutos) produzido após a reação 60 µg de YG₅-DOTA com 185 (A), 370 (B) e 740 MBq (C) de ⁶⁸GaCl₃ por 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸GaCl₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR intermediário.

Fixou-se a massa de YG₅-DOTA em 60 µg e a atividade de ⁶⁸GaCl₃ em 740 MBq (20 mCi) para análise do efeito do tempo de reação sobre a pureza radioquímica das reações e os resultados de pureza radioquímica e os perfis de CLAE do marcador molecular obtido em cada tempo são apresentados na TAB. 33 e FIG. 63, respectivamente. Pode-se observar, pelos valores de pureza radioquímica (TAB. 33), que a redução no tempo de reação reduz a pureza radioquímica calculada por CCD e aumenta a pureza radioquímica calculada por CLAE. Observando-se os perfis de CLAE da FIG. 63, percebe-se que essa diferença de tendência entre valores de pureza radioquímica calculada por CCD e CLAE se deve ao fato de que a redução no tempo de reação aumenta o percentual de ⁶⁸GaCl₃ livre no meio de reação, mas reduz a porcentagem de produtos de radiólise, os quais não são separados por CCD. A CCD é útil, portanto, para determinação de ⁶⁸GaCl₃ livre na reação, mas a CLAE deve ser sempre utilizada para determinação da pureza radioquímica real, ou seja, da porcentagem de marcador molecular íntegro no meio.

TABELA 33 – Pureza radioquímica do YG₅-DOTA-⁶⁸Ga determinada por CCD e CLAE após 60 µg de YG₅-DOTA reagirem 740 MBq (20 mCi) de ⁶⁸GaCl₃ por 8, 15 ou 30 minutos, a 95 °C e pH 4,0 (n = 3).

Tempo de reação (minutos)	Pureza Radioquímica (%)	
	CCD	CLAE
30	93,50 ± 1,1	72,93 ± 5,3
15	92,44 ± 1,2	76,40 ± 1,0
8	86,67 ± 3,10	81,14 ± 1,5

FIGURA 63 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG₅-DOTA-⁶⁸Ga (TR 15,8 ± 0,2 minutos) produzido após a reação 60 µg de YG₅-DOTA com 740 MBq de ⁶⁸GaCl₃ por 30 (A), 15 (B) e 8 minutos (C), a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸GaCl₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR intermediário.

Com base nos resultados descritos anteriormente, definiu-se como reação padrão de marcação com ^{68}Ga aquela em que 60 μg de peptídeo reagem com 740 MBq de $^{68}\text{GaCl}_3$, por 8 minutos a 95 °C em pH 4,0. O pH e o volume de 300 μL foram mantidos com tampão acetato de sódio 0,2 M. Nessas condições, o tempo total de síntese foi de 16 minutos, sendo 8 minutos para a evaporação do solvente do $^{68}\text{GaCl}_3$ e 8 minutos para a radiomarcação. Caso a purificação do marcador molecular por Sep-Pak C18 seja necessária, deve-se acrescentar mais cinco minutos ao final do processo. Deve-se ressaltar que o tempo de eluição do gerador e fracionamento do eluato para evaporação não estão incluídos no tempo de reação. Considerando todo o processo, o tempo total de síntese em bancada estimado foi de 31 minutos. O tempo decorrente para a realização do processo é um fator importante quando se analisa a viabilidade da marcação de uma molécula com um radioisótopo de meia-vida curta como o ^{68}Ga .

O peptídeo YG₅N-DOTA foi radiomarcado nas condições da reação padrão de marcação e a pureza radioquímica, determinada por CLAE, foi $80,40 \pm 3,8 \%$, e a atividade específica obtida ao final da marcação foi 28 GBq/ μmol . Essa atividade específica é próxima da obtida para os derivados da bombesina BZH3¹⁴ e RM1¹²¹. Após a purificação em Sep-Pak, a pureza radioquímica obtida aumentou para $88,4 \pm 0,3 \%$.

O perfil de CLAE do marcador molecular YG₅N-DOTA- ^{68}Ga antes e após a purificação é apresentado na FIG. 64. O sistema de purificação em Sep-Pak foi efetivo para a remoção do $^{68}\text{GaCl}_3$ livre, mas não removeu da amostra os produtos de radiólise. Esse fato reforça a necessidade da reação de marcação ocorrer por tempos mais curtos uma vez que, ainda que haja maior presença de $^{68}\text{GaCl}_3$ livre no meio de reação, esse pode ser removido pelo processo de purificação, o que não ocorre com os produtos de radiólise, que aparecem em maior proporção nas reações por tempo mais longo.

FIGURA 64 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG₅-DOTA-⁶⁸Ga (TR 15,8 ± 0,2 minutos; 28 GBq/μmol) antes e após a purificação produzido após a reação 60 μg do YG₅N-DOTA com 740 MBq de ⁶⁸GaCl₃ por 8 minutos, a 95 °C e pH 4,0. Pode-se observar a presença de ⁶⁸GaCl₃ livre (TR = 1,60 ± 0,1 minutos), do marcador molecular (TR = 15,8 ± 0,2 minutos) e de algumas espécies de TR intermediário.

8.4.2 Síntese automatizada do YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga

As condições padrão para marcação do YG₅N-DOTA com ⁶⁸Ga em bancada foram semelhantes às utilizadas para marcação em módulo automático. A síntese foi realizada na ausência e presença de etanol 5 % v/v no meio de reação, a fim de verificar a capacidade do etanol de evitar a radiólise do peptídeo durante o processo. O tempo total de síntese, incluindo o processo de purificação, foi de 33 minutos, semelhante ao tempo de síntese em bancada.

Na TAB. 34 apresentam-se os resultados de rendimento da síntese automatizada e pureza radioquímica do YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga. A atividade específica obtida foi de 28 GBq/nmol, a mesma obtida para a síntese em bancada. O rendimento corresponde à porcentagem do total de radioatividade utilizada na síntese que foi recuperada na forma de marcador molecular ao final do processo e não foi alterado significativamente pela adição de etanol ao frasco de reação. Entretanto, a presença de etanol aumentou significativamente a pureza radioquímica do produto obtido.

TABELA 34 – Resultados da síntese automatizada do YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga na ausência e presença de etanol 5 % v/v no meio de reação (n = 2).

Condição da Síntese	Rendimento (%)	Pureza Radioquímica (%) (CLAE)
Sem etanol no meio de reação	72,48 (3,9)	86,75 (0,7)
Com etanol no meio de reação	74,98 (11,3)	98,07 (0,2)

O perfil de CLAE do marcador molecular produzido na ausência e presença de etanol é apresentado na FIG. 65. Não se observa a presença de ⁶⁸GaCl₃ livre nas misturas de radiomarcção, confirmando a eficiência do sistema de purificação para remoção do radioisótopo livre. Observa-se também que a maior pureza radioquímica obtida com o etanol no meio de reação se deve à menor proporção dos produtos de radiólise. O etanol, portanto, além de prevenir a radiólise após a marcação, conforme discutido anteriormente no capítulo 6, também foi capaz de prevenir a radiólise durante a reação de radiomarcção.

FIGURA 65 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga (TR 15,6 ± 0,2 minutos) produzido em módulo automatizado na ausência (A) e presença (B) de etanol 5 % v/v no meio de reação.

8.4.3 Análise da estabilidade do YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga

O YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga, produzido por síntese automatizada na ausência e presença de etanol 5 % v/v foi mantido à temperatura ambiente por até 3 horas. A estabilidade foi avaliada por meio da CLAE, 1 e 3 horas após a síntese, e os resultados estão representados na FIG. 66. A pureza radioquímica do marcador molecular não sofreu alterações significativas durante o período avaliado e para as duas condições, indicando que o marcador molecular é estável à temperatura ambiente.

FIGURA 66 – Perfil de CLAE (radioativo) representativo do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga (TR 15,6 ± 0,2 minutos) produzido em módulo automatizado na ausência (A, B e C) e presença (D, E e F) de etanol 5 % v/v no meio de reação imediatamente (A e D) e após 1 (B e E) e 3 (C e F) horas de armazenamento à temperatura ambiente.

8.4.4 Estudos de biodistribuição em camundongos *BALB/c* sadios e *Nude* com tumor PC-3

Os resultados da biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga em camundongos *BALB/c* sadios e camundongos *Nude* com tumor subcutâneo de células PC-3 encontram-se nas TAB. 35 e 36, respectivamente. Da mesma forma que observado para a biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In em camundongos *BALB/c* (capítulo 6, seção 6.4.6), a captação foi maior no pâncreas e intestinos, tecidos que expressam os receptores BB₂ em camundongos¹¹, e nos rins, órgãos primários de excreção.

TABELA 35 – Biodistribuição do YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga em camundongos *BALB/c* machos 1 e 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0,3 nmol (11 MBq) do marcador molecular (n = 5).

Órgão	Marcador molecular (% AI/g de tecido ou mL de sangue)	
	1 hora	4 horas
Sangue	0,35 ± 0,1	0,15 ± 0,0
Coração	0,28 ± 0,1	0,17 ± 0,0
Pulmões	0,61 ± 0,1	0,28 ± 0,0
Pâncreas	2,73 ± 0,3	2,06 ± 0,3
Baço	0,39 ± 0,1	0,31 ± 0,1
Estômago*	0,35 ± 0,1	0,25 ± 0,1
Fígado	0,27 ± 0,0	0,27 ± 0,1
Rins	4,32 ± 0,5	4,59 ± 0,9
Intestinos*	0,65 ± 0,1	0,77 ± 0,4
Músculo	0,28 ± 0,3	0,12 ± 0,1

* Com conteúdo.

A biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga em camundongos *Nude* implantados com tumor de células PC-3 seguiu o mesmo padrão do marcador molecular para SPECT, com captação significativa no tumor, no pâncreas, nos intestinos e rins nos dois tempos estudados. A concentração de radioatividade nos rins para o marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga foi significativamente maior do que para o YG₅N-DOTA-¹¹¹In. Isso provavelmente se deve à diferença entre a carga dos complexos DOTA-⁶⁸Ga, positivas¹²², e dos complexos DOTA-¹¹¹In, neutras¹⁰⁹. Complexos carregados positivamente podem apresentar maior excreção renal em relação a complexos neutros¹⁰¹.

Conforme discutido no capítulo 6, as razões tumor:músculo indicam o contraste entre a captação tumoral e a radiação de fundo, uma vez que o músculo não apresenta receptores para os peptídeos radiomarcados e sua captação decorre apenas da vascularização. A razão tumor de células PC-3:músculo calculada 1 e 4 horas após a administração foi da mesma ordem de grandeza que a razão calculada para o YG₅N-DTPA-

^{111}In e $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{111}\text{In}$ (TAB. 36), que demonstraram ser efetivos para imagem do tumor PC-3 por SPECT. Esses resultados sugerem que o marcador molecular $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{68}\text{Ga}$ pode também ser uma ferramenta útil para o diagnóstico de tumores que expressam o receptor BB_2 por PET.

TABELA 36 – Biodistribuição do $\text{YG}_5\text{N-DOTA-}^{68}\text{Ga}$ em camundongos *Nude* machos com tumor subcutâneo de células PC-3, 1 e 4 horas após a administração por via endovenosa caudal de 0,3 nmol (11 MBq) do marcador molecular (n = 5).

Órgão	Marcador molecular (% AI/g de tecido ou mL de sangue)	
	1 hora	4 horas
Tumor	$0,87 \pm 0,1$	$0,58 \pm 0,1$
Sangue	$0,26 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,1$
Coração	$0,18 \pm 0,0$	$0,11 \pm 0,0$
Pulmões	$0,49 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,0$
Pâncreas	$3,55 \pm 0,3$	$3,04 \pm 0,6$
Baço	$0,43 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,3$
Estômago*	$0,24 \pm 0,1$	$0,23 \pm 0,1$
Fígado	$0,27 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,0$
Rins	$5,22 \pm 0,7$	$3,98 \pm 0,7$
Intestinos*	$0,77 \pm 0,2$	$0,72 \pm 0,2$
Músculo	$0,13 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,0$
Razões tumor:órgãos		
	1 hora	4 horas
Tumor:Pâncreas	0,25	0,19
Tumor:Rins	0,17	0,15
Tumor:Fígado	3,22	2,07
Tumor:Músculo	6,70	9,66

* Com conteúdo.

8.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados discutidos anteriormente, pode-se concluir que:

- ✓ o YG₅N-DOTA pode ser facilmente radiomarcado com ⁶⁸Ga em bancada e utilizando sistema automatizado e o tempo de síntese para os dois métodos é semelhante;
- ✓ o sistema de purificação em Sep-Pak C18 é efetivo para eliminação do ⁶⁸GaCl₃ livre das misturas de reação, mas não elimina os produtos de radiólise;
- ✓ a radiomarcagem em sistema automatizado com etanol (5 % v/v) no meio de reação confere maior pureza radioquímica ao produto final, sem prejuízo no rendimento da marcação;
- ✓ o marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga foi estável à temperatura ambiente por até 3 horas;
- ✓ o perfil de biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga em animais sadios e com tumor de células PC-3 é semelhante ao obtido para o YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In, e as razões tumor:músculo para os três marcadores moleculares são da mesma ordem de grandeza;
- ✓ o YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico de tumores que expressam receptores BB₂ por PET.

ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

Neste capítulo apresentam-se a revisão bibliográfica, os métodos, os resultados e as discussões referentes aos estudos toxicológicos realizados com os derivados da bombesina em ratos, com ênfase nos efeitos tóxicos inerentes à administração dos derivados por via endovenosa.

9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- ✓ Caracterizar a mortalidade, os sintomas tóxicos e o aparecimento de lesões tissulares decorrentes da administração de derivados da bombesina;
- ✓ avaliar a toxicidade hematológica de derivados da bombesina;
- ✓ determinar a toxicidade hepática decorrente da administração de derivados da bombesina;
- ✓ avaliar a toxicidade renal causada pela administração de derivados da bombesina;
- ✓ discutir a segurança de derivados da bombesina para administração em humanos.

9.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA APLICADA

Antes de iniciar com estudos clínicos, todo novo fármaco deve ser submetido a estudos pré-clínicos para avaliação de sua segurança¹²³. Os estudos que devem ser realizados são definidos pela autoridade reguladora do país onde os estudos clínicos serão realizados. No caso do Brasil, a agência que regula esses estudos é a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que até poucos anos atrás não possuía nenhuma legislação específica para radiofármacos. Entretanto, no fim de 2009, a Resolução da Diretoria Consultiva nº 64 (RDC 64 de 18/12/2009) entrou em vigor, estabelecendo os requisitos mínimos para registro de radiofármacos. Dentre esses requisitos estão os estudos toxicológicos.

Para cada fármaco, sete diferentes aspectos devem ser analisados do ponto de vista toxicológico: (I) toxicidade aguda; (II) toxicidade subaguda ou crônica; (III) estudos de reprodução; (IV) potencial mutagênico; (V) potencial carcinogênico; (VI) teste de tolerância local e (VII) toxicidade provocada por impurezas ou produtos de degradação. No caso de radiofármacos para aplicações diagnósticas, a administração é geralmente única e a quantidade de fármaco administrado é limitada, apresentando a toxicidade aguda pouca importância. Entretanto, deve-se conhecer a dose única a ser administrada para planejamento de um estudo de toxicidade subaguda. Estes estudos, por sua vez, são realizados para determinar os órgãos ou sistemas-alvo e a dose administrada em que não se observa efeito tóxico. A escolha da espécie deve considerar fatores farmacocinéticos e metabólicos em comparação com humanos e análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas devem ser realizadas. Além dos testes de toxicidade subaguda, deve-se avaliar a mutagenicidade da molécula não radiomarcada, uma vez que a administração de uma molécula mutagênica pode potencializar o risco decorrente da exposição do paciente à radiação¹²³.

Apesar dos estudos toxicológicos para precursores de radiofármacos representarem uma exigência recente da ANVISA, eles já são exigidos por órgãos reguladores dos Estados Unidos (FDA – Food and Drug Administration) e da União Européia (Ema – European Medicines Agency) para a realização de estudos clínicos há mais de 10 anos. Muitos compostos não chegam a serem avaliados em estudos clínicos devido à toxicidade em animais e estima-se que cerca de 50 % dos efeitos tóxicos pré-clínicos se correlacionem com os efeitos tóxicos observados em estudos clínicos¹²⁴. Ainda assim, há pouca informação disponível acerca dos ensaios toxicológicos com radiofármacos já em comercialização e o mesmo se observa com novos radiofármacos. Isso provavelmente se deve às particularidades dessa classe de medicamentos, as quais podem justificar a adaptação dos estudos toxicológicos a cada caso, mas não reduzir sua importância ou suspender a sua realização.

9.3 MATERIAIS E MÉTODOS

9.3.1 Infraestrutura

Os ensaios correspondentes a esta etapa do trabalho foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ–USP).

9.3.2 Materiais

9.3.2.1 Reagentes

Os principais reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ Solução de NaCl 0,9 % (p/v) em água, estéril e apirrogênica;
- ✓ Dopalen[®] (cetamina; Vetbrands[™], São Paulo, Brasil);
- ✓ Anasedan[®] (xilazina; Vetbrands[™], São Paulo, Brasil);
- ✓ reagentes da Bioclin (São Paulo, Brasil).

Os reagentes utilizados e não listados acima são de mesma origem dos reagentes listados nos capítulos anteriores.

9.3.2.2 Equipamentos e sistemas

Os principais equipamentos utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ Equipamento para realização de hemograma completo Vet ABC[™] Animal Blood Counter (HORIBA ABX Diagnostics, EUA);
- ✓ equipamento para determinação de parâmetros bioquímicos séricos CELM (São Paulo, Brasil).

9.3.2.3 Tampões e soluções

Os principais tampões e soluções utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- ✓ EDTA 10 % (p/v) em PBS;
- ✓ formaldeído 10 % (v/v) em água.

9.3.2.4 Animais

Os estudos foram realizados em ratos machos da linhagem *Wistar*, de 10 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (FMVZ-USP). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

9.3.3 Métodos

9.3.3.1 Estudos toxicológicos

Os estudos toxicológicos foram realizados com os derivados YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA, com o propósito de avaliar se a administração dos derivados da bombesina pode causar dano aos diferentes tecidos do organismo. O derivado YG₅N-DTPA foi escolhido por conter a sequência de aminoácidos que apresentou maior captação tumoral nos estudos descritos no capítulo 6 e que foi envolvida em todos os demais estudos. A realização dos estudos com o derivado YG₅-DTPA justifica-se pela necessidade de elucidar se a substituição da metionina terminal pela norleucina altera a toxicidade dos derivados da bombesina.

Os derivados da bombesina, diluídos em 0,2 mL de solução de NaCl 0,9 % p/v estéril e apirogênica (200 µg/kg; aproximadamente 1000 x a massa que seria administrada a um adulto de 70 kg – 0,2 µg/kg), ou 0,2 mL solução de NaCl 0,9 % p/v estéril e apirogênica (grupo controle) foram injetados por via endovenosa caudal nos ratos *Wistar*. O peso e o consumo de água e ração dos animais foram avaliados diariamente. Após 24 horas, 7 ou 14 dias, procedeu-se à eutanásia dos ratos por decapitação e fez-se a coleta do sangue em 2 tubos cônicos de 15 mL, um contendo EDTA 10 % em PBS e o outro sem anticoagulante para obtenção do soro. Em seguida, realizou-se o hemograma completo em aparelho automatizado e a determinação dos parâmetros bioquímicos alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina por método colorimétrico através de kits da Bioclin em aparelho automatizado. Adicionalmente, 14 dias após a administração, determinou-se também a glicose, colesterol, proteínas totais e albumina séricas. Por fim, fragmentos

representativos do fígado, rins e pâncreas foram coletados, fixados em formaldeído 10 % em água para avaliação histopatológica por microscopia óptica após coloração com hematoxilina/eosina. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

9.3.3.2 Análise estatística

Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Desvio padrão. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para se verificar a homocedasticidade dos dados, utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett's para comparação entre o grupo controle e cada grupo tratado. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunns para comparação entre dois grupos, sendo que ambos foram utilizados também para os dados não homocedásticos. Foram consideradas significativas as análises que apresentaram nível de significância $p < 0,05$.

9.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante todo o tempo nos quais os animais foram avaliados, a ocorrência de morte não foi registrada nos grupos de animais controle, nem nos grupos de animais tratados.

Na FIG. 67 apresentam-se os resultados da análise dos sintomas tóxicos decorrentes da administração dos derivados da bombesina, representados pelo consumo de água, ração e da variação do peso dos animais controle e tratados com YG₅-DTPA ou YG₅N-DTPA 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % (animais controle) ou um dos derivados da bombesina (200 μ g/kg). Os animais tratados apresentaram ganho de peso, consumo de ração e consumo de água semelhante aos animais controle, tanto 7 quanto 14 dias após a administração, não sendo as diferenças observadas entre os grupos tratados e o grupo controle estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

FIGURA 67 – Variação do peso e consumo de ração e água dos animais controle (barras cinzas), administrados com solução de NaCl 0,9 %, e tratados com YG₅-DTPA (barras vermelhas) e YG₅N-DTPA (barras azuis) (200 µg/kg) (n = 5).

Na FIG. 68 apresentam-se os resultados da análise das células vermelhas, da hemoglobina e do hematócrito dos animais controle e tratados, 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA (200 µg/kg). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos tratados quando comparados ao controle correspondente em todos os parâmetros analisados.

FIGURA 68 – Células vermelhas, hemoglobina e hematócrito dos animais controle e tratados 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG₅-DTPA (barras vermelhas) e YG₅N-DTPA (barras azuis) (n = 5).

Na TAB. 37 apresentam-se os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) para os animais controle e tratados nos três tempos analisados após a administração. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e controle correspondente em todos os parâmetros analisados, exceto para a CHCM dos animais tratados com YG₅-DTPA 7 dias após a administração (p = 0,0006). Entretanto, essa diferença não foi observada para a hemoglobina dos animais, não sendo indicativa de anemia hipocrômica.

TABELA 37 – Índices hematimétricos dos animais controles e tratados 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA (n = 5). Dados: VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média.

Parâmetro	Tempo	Controle	YG ₅ -DTPA	YG ₅ N-DTPA
VCM (fm ³)	24 horas	60,13 ± 4,0	63,60 ± 0,9	57,75 ± 1,1
	7 dias	59,41 ± 3,7	60,40 ± 1,1	55,84 ± 1,4
	14 dias	60,20 ± 1,9	60,20 ± 1,1	60,80 ± 1,3
HCM (pg)	24 horas	19,70 ± 3,0	22,44 ± 0,6	17,18 ± 0,3
	7 dias	19,56 ± 2,2	14,44 ± 3,6	17,38 ± 0,5
	14 dias	19,90 ± 0,9	20,14 ± 0,8	20,66 ± 0,7
CHCM (fm ³)	24 horas	32,57 ± 2,8	35,44 ± 0,8	29,56 ± 0,4
	7 dias	32,91 ± 2,1	23,92 ± 5,7	31,16 ± 0,4
	14 dias	32,98 ± 0,7	33,52 ± 1,9	33,88 ± 0,8

Os resultados da análise das células brancas e das plaquetas dos animais controles e tratados com YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA (200 µg/kg) 24 horas, 7 e 14 dias após a administração podem ser visualizados na FIG. 69. Não foram observadas diferenças significativas entre o número de células brancas e plaquetas dos animais controle e tratados nos três tempos analisados. Esses resultados, juntamente com os resultados obtidos para a série vermelha e para os índices hematimétricos, sugerem que os derivados da bombesina estudados não apresentam toxicidade hematológica quando administrados até a concentração analisada.

FIGURA 69 – Número de células brancas e plaquetas dos animais controle e tratados 24 horas, 7 e 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados YG₅-DTPA (barras vermelhas) e YG₅N-DTPA (barras azuis) 200 µg/kg (n = 5).

A ALT é o marcador laboratorial de efeitos hepatotóxicos mais utilizado em estudos pré-clínicos e clínicos. Não apresenta índices significativos de falsos-negativos para dano hepático e a frequência de falsos-positivos é limitada. Sua determinação é, portanto, considerada padrão ouro para avaliação de dano hepático¹²⁴. Além da ALT, a AST e a FA séricas também são utilizadas para análise de dano hepático provocado por medicamentos. A localização dessas enzimas nas células, bem como suas atividades biológicas são apresentadas na TAB. 38.

TABELA 38 – Localização, atividade biológica e dano indicado pelos marcadores séricos de função hepática utilizados nesse trabalho para monitorar os animais controle e tratados com os derivados da bombesina¹²⁴.

Marcador	Localização na célula	Atividade biológica	Tecidos em que se localiza	Dano que indica
ALT*	Citoplasma e mitocôndria	Redução de grupos amino	Vários	Necrose
AST	Citoplasma e mitocôndria	Redução de grupos amino	Vários	Necrose
FA	Membrana celular	Fosfatase	Vários	Colestase biliar

* A ALT apresenta um subconjunto, a ALT 1, que é restrita ao fígado e, por isso é considerada o padrão ouro.

Os resultados da avaliação da ALT, da aspartato aminotransferase (AST) e da fosfatase alcalina (FA), marcadores séricos de função hepática, nos animais controle e tratados com os derivados da bombesina, 24 horas, 7 e 14 dias após a administração são apresentados na FIG. 70. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos tratados quando comparados aos controles correspondentes em todos os parâmetros analisados. Entretanto, observa-se um aumento significativo da ALT sérica nos animais 14 dias após a administração, em relação à ALT sérica 24 horas e 7 dias após a administração. Apesar de esse aumento poder representar dano hepático, ele ocorreu em todos os grupos de animais – controle e tratados, não sendo decorrente da administração dos derivados da bombesina. A variação da ALT sérica pode ser decorrente de variações ambientais e alimentares, às quais todos os grupos estiveram sujeitos. O aumento significativo no peso dos animais de 7 para 14 dias após a administração (FIG. 67) é um indicativo de variação na ingestão de alimentos por parte dos animais, que pode ter provocado o aumento na ALT sérica. Fragmentos dos fígados dos animais controles e tratados foram retirados para análise histológica e os resultados serão descritos mais adiante.

Os resultados da determinação de enzimas séricas sugerem que os derivados da bombesina estudados não apresentam toxicidade hepática quando administrados até a concentração analisada.

FIGURA 70 – Parâmetros séricos de função hepática dos animais controle (barras cinzas) e tratados com YG₅-DTPA (barras vermelhas) ou YG₅N-DTPA (barras azuis) (200 µg/kg) (n = 5). DADOS: ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; FA – fosfatase alcalina.

Do ponto de vista dos marcadores de nefrotoxicidade, destacam-se a determinação da creatina e uréia séricas, bem como a medida do volume urinário. A creatinina é o produto da quebra da creatina à fosfocreatina no músculo esquelético e posterior metabolização da fosfocreatinina no fígado. É liberada no plasma e filtrada no glomérulo renal. Se a filtração é ineficiente, a creatinina sérica aumenta, sugerindo ocorrência de lesão renal. Já a uréia é um produto solúvel em água do metabolismo de proteínas. A sua concentração sérica é inversamente proporcional à filtração glomerular, mas vários fatores influenciam sua produção e excreção, tornando o seu valor limitado¹²⁵.

Os resultados da avaliação dos marcadores séricos de função renal após a administração de YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA (animais tratados) ou solução de NaCl 0,9 % p/v (animais controles) são apresentados na TAB. 39. Não foram observadas diferenças

estatisticamente significativas nos grupos tratados quando comparados aos controles correspondentes em todos os parâmetros analisados. Os resultados obtidos sugerem que, mesmo sendo os rins a principal via de excreção dos derivados, esses não apresentam toxicidade renal quando administrados até a concentração analisada.

TABELA 39 – Parâmetros séricos de função renal dos animais controle e tratados com YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA (200 µg/kg) 24 horas, 7 e 14 dias após a administração por via endovenosa (n = 5).

Parâmetro	Tempo	Controle	YG ₅ -DTPA	YG ₅ N-DTPA
Creatinina (mg/dL)	24 horas	0,92 ± 0,3	0,88 ± 0,2	0,85 ± 0,2
	7 dias	1,12 ± 0,5	1,13 ± 0,2	1,13 ± 0,4
	14 dias	0,67 ± 0,1	0,70 ± 0,1	0,80 ± 0,1
Uréia (mg/dL)	24 horas	62,40 ± 6,8	60,00 ± 4,7	62,00 ± 2,5
	7 dias	50,40 ± 7,2	53,20 ± 5,5	55,50 ± 4,3
	14 dias	60,60 ± 5,0	59,20 ± 11,9	62,60 ± 14,3

Além dos parâmetros descritos anteriormente, a glicose, o colesterol, as proteínas totais e a albumina séricas dos animais foram determinadas 14 dias após a administração de solução de NaCl 0,9 % p/v ou dos derivados da bombesina 200 µg/kg e os resultados obtidos encontram-se na TAB. 39. A glicose é uma medida de dano pancreático¹²⁶ e é um parâmetro que deve ser analisado no caso de derivados da bombesina, uma vez que a maior concentração de receptores BB₂ ocorre no pâncreas¹¹. O nível de colesterol é determinado pelo metabolismo lipídico que, por sua vez, é influenciado pela dieta e pelas funções do fígado, rins, tireóide e outros órgãos do sistema endócrino. A albumina é a principal proteína do plasma e sua concentração é influenciada pelo estado nutricional, função hepática e várias doenças. Esses parâmetros, avaliados em conjunto, fornecem um indicativo do estado geral dos animais e do funcionamento de diversos sistemas em conjunto, principalmente dos sistemas hepático e renal. Com base nos resultados da TAB. 39, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de glicose, colesterol, proteínas totais e albumina séricas dos animais controle e tratados, sugerindo que a administração dos derivados não alterou

o funcionamento dos diversos sistemas do organismo.

TABELA 40 – Outros parâmetros séricos dos animais controle e tratados com YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA (200 µg/kg) 14 dias após a administração (n = 5).

Parâmetro	Controle	YG ₅ -DTPA	YG ₅ N-DTPA
Glicose (mg/dL)	249,60 ± 107,3	266,30 ± 82,3	343,40 ± 102,8
Colesterol (mg/dL)	123,80 ± 12,4	128,50 ± 21,4	131,60 ± 20,1
Proteínas totais (g/dL)	7,00 ± 0,6	6,93 ± 1,3	7,80 ± 1,1
Albumina (g/dL)	4,02 ± 0,2	3,95 ± 0,5	4,24 ± 0,4

A análise histopatológica foi realizada no pâncreas, fígado e rins dos animais, a fim de verificar se a administração dos derivados da bombesina induz o aparecimento de lesões tissulares. O pâncreas, fígado e rins foram os órgãos escolhidos por serem os órgãos de ligação específica, metabolismo e excreção, respectivamente. A análise histopatológica dos órgãos dos animais não demonstrou alterações histológicas significativas nos órgãos dos animais tratados com YG₅-DTPA ou YG₅N-DTPA em relação aos animais controle em todos os tempos estudados, sugerindo que esses derivados não provocam dano tecidual quando administrados até a concentração analisada. Fotomicrografias representativas dos órgãos dos animais 24 horas, 7 e 14 dias após a administração são apresentadas nas FIG. 71, 72 e 73, respectivamente.

FIGURA 71 – Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado, rim e pâncreas após coloração com hematoxilina/eosina dos animais controle e tratados com YG₅-DTPA ou YG₅N-DTPA 24 horas após a administração endovenosa.

FIGURA 72 – Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado, rim e pâncreas após coloração com hematoxilina/eosina dos animais controle e tratados com YG₅-DTPA ou YG₅N-DTPA 7 dias após a administração endovenosa.

FIGURA 73 – Fotomicrografias representativas (aumento de 100x) do fígado, rim e pâncreas após coloração com hematoxilina/eosina dos animais controle e tratados com YG₅-DTPA ou YG₅N-DTPA 14 dias após a administração endovenosa.

9.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados discutidos anteriormente, pode-se concluir que após a administração endovenosa dos derivados da bombesina YG₅-DTPA e YG₅N-DTPA em dose única de 1000 x a massa que seria injetada por kg em um ser humano de 70 kg:

- ✓ Os derivados da bombesina não provocaram a mortalidade ou sintomas tóxicos em ratos até 14 dias após a administração;
- ✓ os derivados da bombesina não provocaram toxicidade hematológica em ratos até 14 dias após a administração;
- ✓ os derivados da bombesina não provocaram toxicidade hepática em ratos até 14 dias após a administração;
- ✓ os derivados da bombesina não provocaram toxicidade renal em ratos até 14 dias após a administração;
- ✓ os derivados da bombesina são seguros para administração em humanos, não tendo apresentado sinais de toxicidade nos estudos toxicológicos pré-clínicos em ratos.

10

CONCLUSÕES

Neste capítulo apresentam-se as conclusões finais do presente trabalho, considerando os resultados discutidos nos capítulos anteriores.

10.1 MARCADORES MOLECULARES PARA APLICAÇÃO EM SPECT

Os marcadores moleculares YG₃, YG₅ e YG₅N conjugados ao DTPA foram obtidos com alta pureza radioquímica e alta atividade específica. O marcador molecular YG₅N-DTPA-¹¹¹In apresentou maior captação pancreática e tumoral nos estudos pré-clínicos em camundongos saudáveis e implantados com células de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3), o que sugere a sua capacidade de reconhecer os receptores BB₂, tendo sido o escolhido para realização dos estudos comparativos entre os quelantes bifuncionais DTPA e DOTA.

O YG₅N-DOTA foi também radiomarcado com ¹¹¹In com alta pureza radioquímica e a atividade específica obtida foi menor em relação ao derivado conjugado ao DTPA. O marcador molecular YG₅N-DOTA-¹¹¹In apresentou afinidade semelhante ao conjugado ao DTPA pelos receptores em células tumorais de próstata (PC-3 e LNCaP) e mama, mas este último se ligou menos e foi menos internalizado; além de ter apresentado menor estabilidade *in vitro* em plasma de camundongo e *in vivo* em soro de camundongo e no tumor de células PC-3. O YG₅N-DOTA-¹¹¹In também apresentou maior captação tumoral do que o YG₅N-DTPA-¹¹¹In no tumor de células PC-3, mas a captação tumoral pelo tumor de células LNCaP foi semelhante para os dois marcadores

moleculares, bem como a captação pancreática e intestinal.

Apesar da menor captação pelo tumor de células PC-3, tanto o YG₅N-DTPA-¹¹¹In quanto o YG₅N-DOTA-¹¹¹In foram ferramentas úteis para imagem desses tumores *in vivo* em camundongos e apresentaram a vantagem da menor captação abdominal e razões tumor:tecidos sadios mais favoráveis, quando comparados ao derivado da bombesina BZH3-¹¹¹In.

10.2 MARCADORES MOLECULARES PARA APLICAÇÃO EM PET

O YG₅N-DOTA foi facilmente radiomarcado com ⁶⁸Ga em bancada e utilizando sistema automatizado e o tempo de síntese para os dois métodos foi semelhante. O marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga apresentou estabilidade à temperatura ambiente por até 3 horas.

O perfil de biodistribuição do marcador molecular YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga em animais sadios e com tumor de células PC-3 foi semelhante ao obtido para o YG₅N-DTPA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-¹¹¹In, e as razões tumor:músculo para os três marcadores moleculares são da mesma ordem de grandeza, indicando que o YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga também pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico de tumores que expressam receptores BB₂ por PET.

10.3 APLICABILIDADE DOS MARCADORES MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE TUMORES EM HUMANOS

Os marcadores moleculares YG₅N-DTPA-¹¹¹In, YG₅N-DOTA-¹¹¹In e YG₅N-DOTA-⁶⁸Ga são promissores para o diagnóstico de tumores que superexpressam os receptores BB₂ por SPECT e PET. A realização de um estudo clínico com esses marcadores moleculares é viável e sua administração é segura, visto que não foram observadas alterações hematológicas, hepáticas, renais ou teciduais significativas em ratos administrados com 1000 x a massa dos derivados que seria administrada em humanos por quilograma de peso corporal. Recomenda-se que os estudos clínicos sejam iniciados com pacientes com tumor de próstata, visto que os marcadores moleculares foram extensivamente estudados nesse tipo de tumor e com diferentes níveis de expressão do receptor BB₂, tendo sido efetivos para imagem dos tumores PC-3 (maior nível de expressão dos receptores) e LNCaP (menor nível de expressão dos receptores) subcutâneos em camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 WEATHERMAN, K. D.; CRISP, W.; WEBER, H. The physiological basis of radiopharmaceuticals. In: SMITH, B. T. (Ed.). **Nuclear pharmacy**. Londres: Pharmaceutical Press, 2010. cap. 3, p.55-66.
- 2 SMITH, B. T. Radioactive drugs in medicine: radiopharmaceuticals. In: SMITH, B. T. (Ed.). **Nuclear pharmacy**. Londres: Pharmaceutical press, 2010. cap. 1, p.1-12.
- 3 JURISSON, S.; CUTLER, C.; SMITH, S. V. Radiometal complexes: characterization and relevant *in vitro* studies. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 52, n. 3, p. 222-234, 2008.
- 4 WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy. **Semin Nucl Med**, v. 31, n. 4, p. 296-311, 2001.
- 5 NANDA, P. K.; LANE, S. R.; RETZLOFF, L. B.; PANDEY, U. S.; SMITH, C. J. Radiolabeled regulatory peptides for imaging and therapy. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 17, n. 1, p. 69-76, 2010.
- 6 WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Appl Radiat Isot**, v. 57, n. 5, p. 749-763, 2002.
- 7 LAVERMAN, P.; SOSABOWSKI, J. K.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. Radiolabelled peptides for oncological diagnosis. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 39 Suppl 1, p. S78-92, 2012.

- 8 ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. **Experientia**, v. 27, n. 2, p. 166-167, 1971.
- 9 MADDALENA, M. E.; FOX, J.; CHEN, J.; FENG, W.; CAGNOLINI, A.; LINDER, K. E.; TWEEDE, M. F.; NUNN, A. D.; LANTRY, L. E. ¹⁷⁷Lu-AMBA biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. **J Nucl Med**, v. 50, n. 12, p. 2017-2024, 2009.
- 10 JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F.; SPINDEL, E. R.; BENYA, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 1, p. 1-42, 2008.
- 11 REUBI, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Endocr Rev**, v. 24, n. 4, p. 389-427, 2003.
- 12 MOODY, T. W.; CRAWLEY, J. N.; JENSEN, R. T. Pharmacology and neurochemistry of bombesin-like peptides. **Peptides**, v. 3, n. 3, p. 559-563, 1982.
- 13 VARVARIGOU, A.; BOUZIoTIS, P.; ZIKOS, C.; SCOPINARO, F.; DE VINCENTIS, G. Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 19, n. 2, p. 219-229, 2004.
- 14 SCHUHMACHER, J.; ZHANG, H.; DOLL, J.; MACKE, H. R.; MATYS, R.; HAUSER, H.; HENZE, M.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M. GRP receptor-targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a ⁶⁸Ga-labeled bombesin(6-14) analog. **J Nucl Med**, v. 46, n. 4, p. 691-699, 2005.
- 15 LIU, Z.; YAN, Y.; LIU, S.; WANG, F.; CHEN, X. ¹⁸F, ⁶⁴Cu, and ⁶⁸Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer. **Bioconjug Chem**, v. 20, n. 5, p. 1016-1025, 2009.
- 16 HONER, M.; MU, L.; STELLFELD, T.; GRAHAM, K.; MARTIC, M.; FISCHER, C. R.; LEHMANN, L.; SCHUBIGER, P. A.; AMETAMEY, S. M.; DINKELBORG, L.; SRINIVASAN, A.; BORKOWSKI, S. ¹⁸F-labeled bombesin analog for specific and effective targeting of prostate tumors expressing gastrin-releasing peptide receptors. **J Nucl Med**, v. 52, n. 2, p. 270-278, 2011.

- 17 LANE, S. R.; NANDA, P.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S. D.; HOFFMAN, T. J.; JURISSON, S. S.; SMITH, C. J. Optimization, biological evaluation and microPET imaging of copper-64-labeled bombesin agonists, [^{64}Cu -NO₂A-(X)-BBN(7-14)NH₂], in a prostate tumor xenografted mouse model. **Nucl Med Biol**, v. 37, n. 7, p. 751-761, 2010.
- 18 GARRISON, J. C.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; NAZ, F.; SUBLETT, S. V.; FIGUEROA, S. D.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Evaluation of the pharmacokinetic effects of various linking group using the ^{111}In -DOTA-X-BBN(7-14)NH₂ structural paradigm in a prostate cancer model. **Bioconjug Chem**, v. 19, n. 9, p. 1803-1812, 2008.
- 19 GARCIA GARAYOA, E.; SCHWEINSBERG, C.; MAES, V.; RUEGG, D.; BLANC, A.; BLAUENSTEIN, P.; TOURWE, D. A.; BECK-SICKINGER, A. G.; SCHUBIGER, P. A. New [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]bombesin analogues with improved biodistribution for targeting gastrin releasing-peptide receptor-positive tumors. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 51, n. 1, p. 42-50, 2007.
- 20 LANTRY, L. E.; CAPPELLETTI, E.; MADDALENA, M. E.; FOX, J. S.; FENG, W.; CHEN, J.; THOMAS, R.; EATON, S. M.; BOGDAN, N. J.; ARUNACHALAM, T.; REUBI, J. C.; RAJU, N.; METCALFE, E. C.; LATTUADA, L.; LINDER, K. E.; SWENSON, R. E.; TWEEDLE, M. F.; NUNN, A. D. ^{177}Lu -AMBA: Synthesis and characterization of a selective ^{177}Lu -labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. **J Nucl Med**, v. 47, n. 7, p. 1144-1152, 2006.
- 21 ZHANG, H.; CHEN, J.; WALDHERR, C.; HINNI, K.; WASER, B.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-177, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors. **Cancer Res**, v. 64, n. 18, p. 6707-6715, 2004.
- 22 WILD, D.; FRISCHKNECHT, M.; ZHANG, H.; MORGENSTERN, A.; BRUCHERTSEIFER, F.; BOISCLAIR, J.; PROVENCHER-BOLLIGER, A.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Alpha-versus beta-particle radiopeptide therapy in a human prostate cancer model (^{213}Bi -DOTA-PESIN and ^{213}Bi -AMBA versus ^{177}Lu -DOTA-PESIN). **Cancer Res**, v. 71, n. 3, p. 1009-1018, 2011.
- 23 FILHO, G. B.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: FILHO, G. B. (Ed.). **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1998. cap. 8,

- 24 MARTIN DE CIVETTA, M. T.; CIVETTA, J. D. [Carcinogenesis]. **Salud Publica Mex**, v. 53, n. 5, p. 405-414, 2011.
- 25 BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R.; MAGNUSSON, R. Global cancer prevention: an important pathway to global health and development. **Public Health**, v. 125, n. 12, p. 821-831, 2011.
- 26 JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.
- 27 INCA. **Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Inca: 118 p. 2012.
- 28 THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- 29 JOSEPHS, D.; SPICER, J.; O'DOHERTY, M. Molecular imaging in clinical trials. **Target Oncol**, v. 4, n. 3, p. 151-168, 2009.
- 30 SAPIENZA, M. T.; BUCHPIEGUEL, C. A. Medicina nuclear em oncologia. In: GUIMARÃES, J. R. Q. (Ed.). **Manual de oncologia**. São Paulo: BBS Editora, 2004. p.675-683.
- 31 KOWALSKY, R. J.; FALEN, S. W. Radiation detection and measurement. In: LANDIS, N. T. (Ed.). **Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine**. 2. Washington: American Pharmacists Association, 2004. p.39-70.
- 32 HAMOUEDEH, M.; KAMLEH, M. A.; DIAB, R.; FESSI, H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 12, p. 1329-1346, 2008.
- 33 PAPATHANASSIOU, D.; LIEHN, J. C. The growing development of multimodality imaging in oncology. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 68, n. 1, p. 60-65, 2008.
- 34 CHOWDHURY, F. U.; SCARSBROOK, A. F. The role of hybrid SPECT-CT in oncology: current and emerging clinical applications. **Clin Radiol**, v. 63, n. 3, p. 241-251, 2008.

- 35 MEJIA, A.; SCHULZ, S.; HYSLOP, T.; WEINBERG, D. S.; WALDMAN, S. A. Molecular staging individualizing cancer management. *J Surg Oncol*, v. 105, n. 5, p. 468-474, 2012.
- 36 KNIGHT, L. C. Radiolabeled peptides for tumor imaging. In: WELCH, M. J. e REDVANLY, C. S. (Ed.). **Handbook of radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications**. Chichester: Wiley, 2003. cap. 23,
- 37 AMBROSINI, V.; FANI, M.; FANTI, S.; FORRER, F.; MAECKE, H. R. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J Nucl Med*, v. 52 Suppl 2, p. 42S-55S, 2011.
- 38 KRENNING, E. P.; BAKKER, W. H.; BREEMAN, W. A.; KOPER, J. W.; KOOLIJ, P. P.; AUSEMA, L.; LAMERIS, J. S.; REUBI, J. C.; LAMBERTS, S. W. Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet*, v. 1, n. 8632, p. 242-244, 1989.
- 39 KRENNING, E. P.; KWEKKEBOOM, D. J.; BAKKER, W. H.; BREEMAN, W. A.; KOOLIJ, P. P.; OEI, H. Y.; VAN HAGEN, M.; POSTEMA, P. T.; DE JONG, M.; REUBI, J. C.; ET AL. Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med*, v. 20, n. 8, p. 716-731, 1993.
- 40 DE JONG, M.; VALKEMA, R.; JAMAR, F.; KVOLS, L. K.; KWEKKEBOOM, D. J.; BREEMAN, W. A.; BAKKER, W. H.; SMITH, C.; PAUWELS, S.; KRENNING, E. P. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med*, v. 32, n. 2, p. 133-140, 2002.
- 41 MARKWALDER, R.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res*, v. 59, n. 5, p. 1152-1159, 1999.
- 42 REUBI, C.; GUGGER, M.; WASER, B. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for *in vivo* multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 29, n. 7, p. 855-862, 2002.
- 43 REUBI, J. C.; FLEISCHMANN, A.; WASER, B.; REHMANN, R. Concomitant vascular GRP-receptor and VEGF-receptor expression in human tumors: molecular basis for dual targeting of tumoral vasculature. *Peptides*, v. 32, n. 7, p. 1457-1462, 2011.

- 44 PATEL, O.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrin-releasing peptide and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1766, n. 1, p. 23-41, 2006.
- 45 HO, C. L.; CHEN, L. C.; LEE, W. C.; CHIU, S. P.; HSU, W. C.; WU, Y. H.; YEH, C. H.; STABIN, M. G.; JAN, M. L.; LIN, W. J.; LEE, T. W.; CHANG, C. H. Receptor-binding, biodistribution, dosimetry, and micro-SPECT/CT imaging of ¹¹¹In-[DTPA(1), Lys(3), Tyr(4)]-bombesin analog in human prostate tumor-bearing mice. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 24, n. 4, p. 435-443, 2009.
- 46 GOURNI, E.; BOUZOTIS, P.; BENAKI, D.; LOUDOS, G.; XANTHOPOULOS, S.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; MAVRI-VAVAGIANNI, M.; PELECANOU, M.; ARCHIMANDRITIS, S. C.; VARVARIGOU, A. D. Structural assessment and biological evaluation of two N₃S bombesin derivatives. **J Med Chem**, v. 52, n. 14, p. 4234-4246, 2009.
- 47 ZHU, J.; GONG, J. Y.; GOODMAN, O. B., JR.; CARTEGNI, L.; NANUS, D. M.; SHEN, R. Bombesin attenuates pre-mRNA splicing of glucocorticoid receptor by regulating the expression of serine-arginine protein p30c (SRp30c) in prostate cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 7, p. 1087-1094, 2007.
- 48 GINJ, M.; ZHANG, H.; WASER, B.; CESCATO, R.; WILD, D.; WANG, X.; ERCHEGYI, J.; RIVIER, J.; MACKE, H. R.; REUBI, J. C. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for *in vivo* peptide receptor targeting of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 44, p. 16436-16441, 2006.
- 49 CESCATO, R.; MAINA, T.; NOCK, B.; NIKOLOPOULOU, A.; CHARALAMBIDIS, D.; PICCAND, V.; REUBI, J. C. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. **J Nucl Med**, v. 49, n. 2, p. 318-326, 2008.
- 50 BEER, M.; MONTANI, M.; GERHARDT, J.; WILD, P. J.; HANY, T. F.; HERMANN, S. T.; MUNTENER, M.; KRISTIANSEN, G. Profiling gastrin-releasing peptide receptor in prostate tissues: clinical implications and molecular correlates. **Prostate**, v. 72, n. 3, p. 318-325, 2012.
- 51 GUGGER, M.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. **Am J Pathol**, v. 155, n. 6, p. 2067-2076, 1999.

- 52 SCHROEDER, R. P.; VAN WEERDEN, W. M.; KRENNING, E. P.; BANGMA, C. H.; BERNDSEN, S.; GRIEVINK-DE LIGT, C. H.; GROEN, H. C.; RENEMAN, S.; DE BLOIS, E.; BREEMAN, W. A.; DE JONG, M. Gastrin-releasing peptide receptor-based targeting using bombesin analogues is superior to metabolism-based targeting using choline for *in vivo* imaging of human prostate cancer xenografts. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging***, v. 38, n. 7, p. 1257-1266, 2011.

- 53 SCOPINARO, F.; DE VINCENTIS, G.; VARVARIGOU, A. D.; LAURENTI, C.; IORI, F.; REMEDIANI, S.; CHIARINI, S.; STELLA, S. ^{99m}Tc-bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging***, v. 30, n. 10, p. 1378-1382, 2003.

- 54 SMITH, C. J.; GALI, H.; SIECKMAN, G. L.; HIGGINBOTHAM, C.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Radiochemical investigations of ^{99m}Tc-N₃S-X-BBN[7-14]NH₂: an *in vitro/in vivo* structure-activity relationship study where X = 0-, 3-, 5-, 8-, and 11-carbon tethering moieties. ***Bioconjug Chem***, v. 14, n. 1, p. 93-102, 2003.

- 55 HOFFMAN, T. J.; GALI, H.; SMITH, C. J.; SIECKMAN, G. L.; HAYES, D. L.; OWEN, N. K.; VOLKERT, W. A. Novel series of ¹¹¹In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. ***J Nucl Med***, v. 44, n. 5, p. 823-831, 2003.

- 56 HU, F.; CUTLER, C. S.; HOFFMAN, T.; SIECKMAN, G.; VOLKERT, W. A.; JURISSON, S. S. Pm-149 DOTA bombesin analogs for potential radiotherapy: *in vivo* comparison with Sm-153 and Lu-177 labeled DO3A-amide-βAla-BBN(7-14)NH₂(2). ***Nucl Med Biol***, v. 29, n. 4, p. 423-430, 2002.

- 57 JOHNSON, C. V.; SHELTON, T.; SMITH, C. J.; MA, L.; PERRY, M. C.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Evaluation of combined ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-AOC-BBN (7-14)NH₂ GRP receptor-targeted radiotherapy and chemotherapy in PC-3 human prostate tumor cell xenografted SCID mice. ***Cancer Biother Radiopharm***, v. 21, n. 2, p. 155-166, 2006.

- 58 LANE, S. R.; VEERENDRA, B.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; HOFFMAN, T. J.; JURISSON, S. S.; SMITH, C. J. ^{99m}Tc(CO)₃-DTMA bombesin conjugates having high affinity for the GRP receptor. ***Nucl Med Biol***, v. 35, n. 3, p. 263-272, 2008.

- 59 FAINTUCH, B. L.; TEODORO, R.; DUATTI, A.; MURAMOTO, E.; FAINTUCH, S.; SMITH, C. J. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. ***Nucl Med Biol***, v. 35, n. 4, p. 401-411, 2008.

- 60 ZHANG, H.; SCHUHMACHER, J.; WASER, B.; WILD, D.; EISENHUT, M.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 34, n. 8, p. 1198-1208, 2007.
- 61 SCHROEDER, R. P.; MULLER, C.; RENEMAN, S.; MELIS, M. L.; BREEMAN, W. A.; DE BLOIS, E.; BANGMA, C. H.; KRENNING, E. P.; VAN WEERDEN, W. M.; DE JONG, M. A standardised study to compare prostate cancer targeting efficacy of five radiolabelled bombesin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 37, n. 7, p. 1386-1396, 2010.
- 62 CHEN, J.; LINDER, K. E.; CAGNOLINI, A.; METCALFE, E.; RAJU, N.; TWEEDLE, M. F.; SWENSON, R. E. Synthesis, stabilization and formulation of [^{177}Lu]Lu-AMBA, a systemic radiotherapeutic agent for Gastrin Releasing Peptide receptor positive tumors. *Appl Radiat Isot*, v. 66, n. 4, p. 497-505, 2008.
- 63 VAN DE WIELE, C.; DUMONT, F.; VANDEN BROECKE, R.; OOSTERLINCK, W.; COCQUYT, V.; SERREYN, R.; PEERS, S.; THORNBAC, J.; SLEGGERS, G.; DIERCKX, R. A. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur J Nucl Med*, v. 27, n. 11, p. 1694-1699, 2000.
- 64 VAN DE WIELE, C.; DUMONT, F.; DIERCKX, R. A.; PEERS, S. H.; THORNBAC, J. R.; SLEGGERS, G.; THIERENS, H. Biodistribution and dosimetry of (99m)Tc-RP527, a gastrin-releasing peptide (GRP) agonist for the visualization of GRP receptor-expressing malignancies. *J Nucl Med*, v. 42, n. 11, p. 1722-1727, 2001.
- 65 VAN DE WIELE, C.; PHONTEYNE, P.; PAUWELS, P.; GOETHALS, I.; VAN DEN BROECKE, R.; COCQUYT, V.; DIERCKX, R. A. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. *J Nucl Med*, v. 49, n. 2, p. 260-264, 2008.
- 66 SANTOS-CUEVAS, C. L.; FERRO-FLORES, G.; ARTEAGA DE MURPHY, C.; PICHARDO-ROMERO, P. A. Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-[Lys³]-bombesin: biokinetics and dosimetry in women. *Nucl Med Commun*, v. 29, n. 8, p. 741-747, 2008.

- 67 CAGNOLINI, A.; CHEN, J.; RAMOS, K.; SKEDZIELEWSKI, T. M.; LANTRY, L. E.; NUNN, A. D.; SWENSON, R. E.; LINDER, K. E. Automated synthesis, characterization and biological evaluation of [(68)Ga]Ga-AMBA, and the synthesis and characterization of (nat)Ga-AMBA and [(67)Ga]Ga-AMBA. **Appl Radiat Isot**, v. 68, n. 12, p. 2285-2292, 2010.

- 68 ROGERS, B. E.; BIGOTT, H. M.; MCCARTHY, D. W.; DELLA MANNA, D.; KIM, J.; SHARP, T. L.; WELCH, M. J. MicroPET imaging of a gastrin-releasing peptide receptor-positive tumor in a mouse model of human prostate cancer using a ⁶⁴Cu-labeled bombesin analogue. **Bioconjug Chem**, v. 14, n. 4, p. 756-763, 2003.

- 69 CHEN, X.; PARK, R.; HOU, Y.; TOHME, M.; SHAHINIAN, A. H.; BADING, J. R.; CONTI, P. S. microPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with ⁶⁴Cu-DOTA-[Lys³]bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. **J Nucl Med**, v. 45, n. 8, p. 1390-1397, 2004.

- 70 PRASANPHANICH, A. F.; NANDA, P. K.; ROLD, T. L.; MA, L.; LEWIS, M. R.; GARRISON, J. C.; HOFFMAN, T. J.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S. D.; SMITH, C. J. [⁶⁴Cu-NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂] targeting vector for positron-emission tomography imaging of gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 30, p. 12462-12467, 2007.

- 71 HOFFMAN, T. J.; SMITH, C. J. True radiotracers: Cu-64 targeting vectors based upon bombesin peptide. **Nucl Med Biol**, v. 36, n. 6, p. 579-585, 2009.

- 72 NANDA, P. K.; PANDEY, U.; BOTTENUS, B. N.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; SZCZODROSKI, A. F.; HOFFMAN, T. J.; SMITH, C. J. Bombesin analogues for gastrin-releasing peptide receptor imaging. **Nucl Med Biol**, v. 39, n. 4, p. 461-471, 2012.

- 73 ZHANG, X.; CAI, W.; CAO, F.; SCHREIBMANN, E.; WU, Y.; WU, J. C.; XING, L.; CHEN, X. ¹⁸F-labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer. **J Nucl Med**, v. 47, n. 3, p. 492-501, 2006.

- 74 YANG, M.; GAO, H.; ZHOU, Y.; MA, Y.; QUAN, Q.; LANG, L.; CHEN, K.; NIU, G.; YAN, Y.; CHEN, X. F-Labeled GRPR Agonists and Antagonists: A Comparative Study in Prostate Cancer Imaging. **Theranostics**, v. 1, p. 220-229, 2011.

- 75 PUJATTI, P. B.; SANTOS, J. S.; MASSICANO, A. V.; MENGATTI, J.; DE ARAUJO, E. B. Development of a new bombesin analog radiolabeled with lutetium-177: *in vivo* evaluation of the biological properties in *balb-C* mice. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 56, n. 2, p. 18-24, 2010.

- 76 PUJATTI, P. B. **Densenvolvimento de derivados da bombesina radiomarcados com Lutécio-177: relação estrutura e potencial diagnóstico-terapêutico para tumor de próstata** 2009. 138 (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 77 PUJATTI, P. B.; SANTOS, J. S.; COUTO, R. M.; MELERO, L. T.; SUZUKI, M. F.; SOARES, C. R.; GRALLERT, S. R.; MENGATTI, J.; DE ARAUJO, E. B. Novel series of ^{177}Lu -labeled bombesin derivatives with amino acidic spacers for selective targeting of human PC-3 prostate tumor cells. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, v. 55, n. 3, p. 310-323, 2011.

- 78 GARCIA GARAYOA, E.; SCHWEINSBERG, C.; MAES, V.; BRANS, L.; BLAUENSTEIN, P.; TOURWE, D. A.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, P. A. Influence of the molecular charge on the biodistribution of bombesin analogues labeled with the $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -core. *Bioconjug Chem*, v. 19, n. 12, p. 2409-2416, 2008.

- 79 VISWANADHAN, V. N.; GHOSE, A. K.; REVANKAR, G. R.; ROBINS, R. K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *J Chem Inf Comput Sci*, v. 29, p. 163-172, 1989.

- 80 CSIZMADIA, F.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; PANDERI, I.; DARVAS, F. Prediction of distribution coefficient from structure. 1. Estimation method. *J Pharm Sci*, v. 86, n. 7, p. 865-871, 1997.

- 81 GALBRAITH, W. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine. In: SMITH, B. T. (Ed.). **Nuclear Pharmacy**. Londres: Pharmaceutical Press, 2010. cap. 6, p.111-186. ISBN 978 0 85369 866 1.

- 82 BREEMAN, W. A.; DE JONG, M.; ERION, J. L.; BUGAJ, J. E.; SRINIVASAN, A.; BERNARD, B. F.; KWEKKEBOOM, D. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. Preclinical comparison of $(111)\text{In}$ -labeled DTPA- or DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J Nucl Med*, v. 43, n. 12, p. 1650-1656, 2002.

- 83 DE VISSER, M.; BERNARD, H. F.; ERION, J. L.; SCHMIDT, M. A.; SRINIVASAN, A.; WASER, B.; REUBI, J. C.; KRENNING, E. P.; DE JONG, M. Novel ^{111}In -labelled bombesin analogues for molecular imaging of prostate tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 34, n. 8, p. 1228-1238, 2007.

- 84 ABD-ELGALIEL, W. R.; GALLAZZI, F.; GARRISON, J. C.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S. D.; HOFFMAN, T. J.; LEVER, S. Z. Design, synthesis, and biological evaluation of an antagonist-bombesin analogue as targeting vector. **Bioconjug Chem**, v. 19, n. 10, p. 2040-2048, 2008.
- 85 WINKELMANN, C. T.; FIGUEROA, S. D.; SIECKMAN, G. L.; ROLD, T. L.; HOFFMAN, T. J. Non-invasive MicroCT Imaging Characterization and In Vivo Targeting of BB₂ Receptor Expression of a PC-3 Bone Metastasis Model. **Mol Imaging Biol**, 2012.
- 86 MANSI, R.; WANG, X.; FORRER, F.; KNEIFEL, S.; TAMMA, M. L.; WASER, B.; CESCATO, R.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 16, p. 5240-5249, 2009.
- 87 HO, C. L.; LIU, I. H.; WU, Y. H.; CHEN, L. C.; CHEN, C. L.; LEE, W. C.; CHUANG, C. H.; LEE, T. W.; LIN, W. J.; SHEN, L. H.; CHANG, C. H. Molecular imaging, pharmacokinetics, and dosimetry of In-AMBA in human prostate tumor-bearing mice. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 101497, 2011.
- 88 WASER, B.; ELTSCHINGER, V.; LINDER, K.; NUNN, A.; REUBI, J. C. Selective *in vitro* targeting of GRP and NMB receptors in human tumours with the new bombesin tracer ¹⁷⁷Lu-AMBA. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 34, n. 1, p. 95-100, 2007.
- 89 MANSI, R.; WANG, X.; FORRER, F.; WASER, B.; CESCATO, R.; GRAHAM, K.; BORKOWSKI, S.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 38, n. 1, p. 97-107, 2011.
- 90 DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc: ^{99m}Tc-litorin and biodistribution in rats. **Bioconjug Chem**, v. 18, n. 5, p. 1516-1520, 2007.
- 91 RITSCHER, W. A.; KEARNS, G. L. Definitions and nomenclature. In: (Ed.). **Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications**. Washington American Pharmacists Association, 2009. cap. 1, p.1-11.
- 92 JIMÉNEZ, Y. V. **Dosimetria interna aplicada a fármacos marcados con ¹⁷⁷Lu**. 2007. (Dissertação de mestrado). Instituto Balseiro, Cuyo.

- 93 SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 5. Nova York: Springer, 2003.
- 94 MAINA, T.; NOCK, B. A.; ZHANG, H.; NIKOLOPOULOU, A.; WASER, B.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Species differences of bombesin analog interactions with GRP-R define the choice of animal models in the development of GRP-R-targeting drugs. *J Nucl Med*, v. 46, n. 5, p. 823-830, 2005.
- 95 CAMPBELL, M. K. Aminoácidos e proteínas. In: (Ed.). **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 3, p.96-117.
- 96 LIU, S.; ELLARS, C. E.; EDWARDS, D. S. Ascorbic acid: useful as a buffer agent and radiolytic stabilizer for metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem*, v. 14, n. 5, p. 1052-1056, 2003.
- 97 PUJATTI, P. B.; MASSICANO, A. V.; MENGATTI, J.; DE ARAUJO, E. B. Preparation of [In-111]-labeled-DTPA-bombesin conjugates at high specific activity and stability: evaluation of labeling parameters and potential stabilizers. *Appl Radiat Isot*, v. 70, n. 5, p. 856-863, 2012.
- 98 LIU, S.; EDWARDS, D. S. Stabilization of (90)Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjug Chem*, v. 12, n. 4, p. 554-558, 2001.
- 99 E.G. GARAYOA, C. S., V. MAES, D. RÜEGG, A. BLANC, P. BLÄUENSTEIN, D.A. TOURWÉ, A.G. BECK-SICKINGER, P.A. SCHUBIGER New [^{99m}Tc]bombesin analogues with improved biodistribution for targeting gastrin releasing-peptide receptor positive tumors. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, v. 51, p. 42-50, 2007.
- 100 KEARNS, W. A. R. G. L. Definitions and nomenclature. In: (Ed.). **Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications**. Washington: American Pharmacists Association, 2009. cap. 1, p.1-11.
- 101 COOPER, M. S.; MA, M. T.; SUNASSEE, K.; SHAW, K. P.; WILLIAMS, J. D.; PAUL, R. L.; DONNELLY, P. S.; BLOWER, P. J. Comparison of (64)Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and *in Vitro/in Vivo* Stability. *Bioconjug Chem*, 2012.
- 102 LA BELLA, R.; GARCIA-GARAYOA, E.; LANGER, M.; BLAUENSTEIN, P.; BECK-SICKINGER, A. G.; SCHUBIGER, P. A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a ^{99m}Tc(I)-labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol*, v. 29, n. 5, p. 553-560, 2002.

- 103 WILKINSON., G. R. Farmacocinética: dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: GOODMAN, L. S. e GILMAN, A. (Ed.). **As Bases farmacológicas da terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: Mc-Graw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2003. cap. 1, p.3-24.

- 104 LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 12, p. 1347-1370, 2008.

- 105 HENS, M.; VAIDYANATHAN, G.; ZHAO, X. G.; BIGNER, D. D.; ZALUTSKY, M. R. Anti-EGFRvIII monoclonal antibody armed with ¹⁷⁷Lu: *in vivo* comparison of macrocyclic and acyclic ligands. **Nucl Med Biol**, v. 37, n. 7, p. 741-750, 2010.

- 106 OCAK, M.; HELBOK, A.; RANGGER, C.; PEITL, P. K.; NOCK, B. A.; MORELLI, G.; EEK, A.; SOSABOWSKI, J. K.; BREEMAN, W. A.; REUBI, J. C.; DECRISTOFORO, C. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 38, n. 8, p. 1426-1435, 2011.

- 107 LIU, Z.; YAN, Y.; LIU, S.; WANG, F.; CHEN, X. (18)F, (64)Cu, and (68)Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer. **Bioconjug Chem**, v. 20, n. 5, p. 1016-1025, 2009.

- 108 HINO, T.; ARAKAWA, T.; IWANARI, H.; YURUGI-KOBAYASHI, T.; IKEDA-SUNO, C.; NAKADA-NAKURA, Y.; KUSANO-ARAI, O.; WEYAND, S.; SHIMAMURA, T.; NOMURA, N.; CAMERON, A. D.; KOBAYASHI, T.; HAMAKUBO, T.; IWATA, S.; MURATA, T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 237-240, 2012.

- 109 MALMBERG, J.; PEROLS, A.; VARASTE, Z.; ALTAI, M.; BRAUN, A.; SANDSTROM, M.; GARSKE, U.; TOLMACHEV, V.; ORLOVA, A.; KARLSTROM, A. E. Comparative evaluation of synthetic anti-HER2 Affibody molecules site-specifically labelled with ¹¹¹In using N-terminal DOTA, NOTA and NODAGA chelators in mice bearing prostate cancer xenografts. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 39, n. 3, p. 481-492, 2012.

- 110 SABBAH, E. N.; KADOUCHE, J.; ELLISON, D.; FINUCANE, C.; DECAUDIN, D.; MATHER, S. J. *In vitro* and *in vivo* comparison of DTPA- and DOTA-conjugated antiferritin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer. **Nucl Med Biol**, v. 34, n. 3, p. 293-304, 2007.

- 111 KHAW, B. A.; KLIBANOV, A.; O'DONNELL, S. M.; SAITO, T.; NOSSIFF, N.; SLINKIN, M. A.; NEWELL, J. B.; STRAUSS, H. W.; TORCHILIN, V. P. Gamma imaging with negatively charge-modified monoclonal antibody: modification with synthetic polymers. *J Nucl Med*, v. 32, n. 9, p. 1742-1751, 1991.
- 112 ABIRAJ, K.; MANSI, R.; TAMMA, M. L.; FANI, M.; FORRER, F.; NICOLAS, G.; CESCATO, R.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Bombesin antagonist-based radioligands for translational nuclear imaging of gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors. *J Nucl Med*, v. 52, n. 12, p. 1970-1978, 2011.
- 113 DIMITRAKOPOULOU-STRAUSS, A.; SEIZ, M.; TUETTENBERG, J.; SCHMIEDER, K.; EISENHUT, M.; HABERKORN, U.; STRAUSS, L. G. Pharmacokinetic studies of Ga-labeled Bombesin (Ga-BZH) and F-18 FDG PET in patients with recurrent gliomas and comparison to grading: preliminary results. *Clin Nucl Med*, v. 36, n. 2, p. 101-108, 2011.
- 114 MARKOVSKY, E.; BAABUR-COHEN, H.; ELDAR-BOOCK, A.; OMER, L.; TIRAM, G.; FERBER, S.; OFEK, P.; POLYAK, D.; SCOMPARIN, A.; SATCHI-FAINARO, R. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *J Control Release*, 2011.
- 115 BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSEGUR, J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)*, v. 85, n. 12, p. 1301-1307, 2007.
- 116 BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSEGUR, J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol*, v. 19, n. 2, p. 223-229, 2007.
- 117 RICE, S. L.; RONEY, C. A.; DAUMAR, P.; LEWIS, J. S. The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology. *Semin Nucl Med*, v. 41, n. 4, p. 265-282, 2011.
- 118 MAECKE, H. R.; HOFMANN, M.; HABERKORN, U. (68)Ga-labeled peptides in tumor imaging. *J Nucl Med*, v. 46 Suppl 1, p. 172S-178S, 2005.
- 119 DECRISTOFORO, C.; KNOPP, R.; VON GUGGENBERG, E.; RUPPRICH, M.; DREGER, T.; HESS, A.; VIRGOLINI, I.; HAUBNER, R. A fully automated synthesis for the preparation of ⁶⁸Ga-labelled peptides. *Nucl Med Commun*, v. 28, n. 11, p. 870-875, 2007.

- 120 DIMITRAKOPOULOU-STRAUSS, A.; HOHENBERGER, P.; HABERKORN, U.; MACKE, H. R.; EISENHUT, M.; STRAUSS, L. G. ^{68}Ga -labeled bombesin studies in patients with gastrointestinal stromal tumors: comparison with ^{18}F -FDG. *J Nucl Med*, v. 48, n. 8, p. 1245-1250, 2007.
- 121 LIU, Z.; NIU, G.; SHI, J.; LIU, S.; WANG, F.; CHEN, X. (68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly₃ and PEG₄ linkers: promising agents for tumor integrin $\alpha_v\beta_3$ PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 36, n. 6, p. 947-957, 2009.
- 122 FANI, M.; DEL POZZO, L.; ABIRAJ, K.; MANSI, R.; TAMMA, M. L.; CESCATO, R.; WASER, B.; WEBER, W. A.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. PET of somatostatin receptor-positive tumors using ^{64}Cu - and ^{68}Ga -somatostatin antagonists: the chelate makes the difference. *J Nucl Med*, v. 52, n. 7, p. 1110-1118, 2011.
- 123 MARZIN, D. Preclinical evaluation of radiopharmaceutical toxicological prerequisites. *Nucl Med Biol*, v. 25, n. 8, p. 733-736, 1998.
- 124 OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.
- 125 MOORE, E.; BELLOMO, R.; NICHOL, A. Biomarkers of acute kidney injury in anesthesia, intensive care and major surgery: from the bench to clinical research to clinical practice. *Minerva Anesthesiol*, v. 76, n. 6, p. 425-440, 2010.
- 126 MOREIRA, M.; MATIAS, J. E.; SOUZA, C. J.; NICOLUZZI, J. E.; CARON, P. E.; REPKA, J. C. Action of tacrolimus in arginine induced experimental acute pancreatitis. *Rev Col Bras Cir*, v. 38, n. 4, p. 260-265, 2011.